

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS,
BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“Evaluación del efecto hipolipemiante de los extractos de las
semillas de *Salvia hispánica* L. (chía) administrado en animales de
experimentación y determinación de la capacidad antioxidante *in*
vitro. Arequipa - 2014”

Presentado por la bachiller:

PAUCCARA HILARIO, Tania Verónica

Para optar el Título Profesional de Químico
Farmacéutico

Asesor:

Mag. María Elena Núñez Guillén

AREQUIPA – PERÚ

2014

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS.....	7
HIPÓTESIS	8
CAPÍTULO I.....	9
MARCO TEÓRICO	9
1.1. <i>SALVIA HISPÁNICA</i> L. (CHÍA)	9
1.1.1. ORIGEN Y ANTECEDENTES.....	9
1.1.2. SINONIMIA.....	9
1.1.3. CLASIFICACION TAXONÓMICA	10
1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	10
1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA	11
1.4. USOS TRADICIONALES	12
1.5. CULTIVO	12
1.6. LÍPIDOS	13
1.6.1. CONCEPTO.....	13
1.6.2. FUNCIONES DE LOS LÍPIDOS	13
1.6.3. PRINCIPALES LÍPIDOS PLASMÁTICOS.....	14
1.6.4. COLESTEROL Y TRIGLICERIDOS	14
1.6.5. LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS	16
1.6.6. METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS	19
1.6.7. COMPONENTES DEL PERFIL LIPÍDICO	21
1.6.8. HIPERLIPIDEMIAS.....	22
1.7. PROCESOS OXIDATIVOS Y ANTIOXIDANTE	23
1.7.1. RADICALES LIBRES Y METABOLITOS REACTIVOS	23
1.7.2. EFECTO NOCIVO DE LOS RADICALES LIBRES	25
1.8. ANTIOXIDANTES	26
1.8.1. CLASIFICACION DE ANTIOXIDANTES	26

1.9.	FARMACOS HIPOLIPEMIANTES	28
1.9.1.	CLASIFICACIÓN DE LOS FARMACOS HIPOLIPEMIANTES	29
1.9.2.	GEMFIBROZILO	29
CAPÍTULO II		32
MATERIALES Y MÉTODOS		32
2.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL	32
2.1.1.	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	32
2.1.2.	UNIDADES DE ESTUDIO	32
2.1.3.	AMBITO GEOGRÁFICO Y TEMPORALIDAD	33
2.2.	MATERIALES DE LABORATORIO, EQUIPOS Y REACTIVOS	33
2.3.	MÉTODOS	36
2.3.1.	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE SALVIA HISPÁNICA L. (CHÍA)	36
2.4.	ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR	38
2.4.1.	IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	38
2.4.2.	PROCEDIMIENTO REALIZADO	39
2.5.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOLIPEMIANTE	40
2.5.1.	ESTANDARIZACIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	40
2.5.2.	DIETA HIPERCALÓRICA CON ALTO CONTENIDO EN LÍPIDOS	41
2.5.3.	OBTENCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA.....	42
2.5.4.	MEDICIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO	43
2.6.	PRUEBA PILOTO DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE	47
2.7.	PRUEBA FINAL DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE	48
2.8.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	49
2.8.1.	MÉTODO CUPRAC.....	49
2.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
CAPÍTULO III.....		53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		53
3.1.	OBTENCIÓN DE LAS SEMILLAS DE “CHÍA” Y EXTRACTOS	53
3.2.	ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR: CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA	55
3.3.	EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE	57
3.3.1.	PRUEBA PILOTO DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE.....	57
3.3.2.	PRUEBA FINAL DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE	64
3.4.	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	77

3.4.1. Preparación de la curva de calibración	77
3.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante	82
CONCLUSIONES.....	84
SUGERENCIAS.....	86
BIBLIOGRAFÍA.....	87
ANEXOS	92



RESUMEN

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivos evaluar el efecto hipolipemiente de los extractos de las semillas de *Salvia hispánica* L. (chía), administrado en animales de experimentación, y determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*.

Para lo cual se llevó a cabo la extracción de los principios activos de las semillas de *Salvia hispánica* L. (chía), esta se realizó mediante equipo de extracción continua Soxhlet, utilizando tres disolventes de distinta polaridad (éter de petróleo, cloroformo y alcohol etílico), luego se determinó el porcentaje de rendimiento de los extractos. Encontrándose un rendimiento de 30% para el extracto con éter de petróleo, 28.30% para cloroformo y 18.92% para el alcohol etílico.

Seguidamente se realizó la prueba piloto que consistía en administrar los diferentes extractos; a dosis de 500 mg/kg/día y 1000 mg/kg/día a dos grupos de tres animales de experimentación por tipo de disolvente durante 30 días, al término de este periodo se midió el nivel de triglicéridos. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA (Análisis de Varianza) y pruebas de Tuckey a un intervalo de confianza del 95%. De donde el extracto obtenido con alcohol etílico y a una dosis de 1000 mg/kg/día tuvo mejor efecto en la disminución del nivel de triglicéridos.

Este último extracto (etanólico) se sometió al análisis fitoquímico preliminar mediante el método de cromatografía en capa fina, en el que se identificaron terpenos, flavonoides, saponinas y taninos.

Teniendo en cuenta los resultados de la prueba piloto se realizó la etapa experimental final, para ello se utilizó 15 ratas de la especie *Rattus norvegicus*. Las cuales fueron divididas en 3 grupos de 5 animales cada uno. El primer grupo “control negativo” no se administró ningún tratamiento, el segundo “grupo tratamiento” se administró el extracto etanólico una dosis de (1 g/kg/día) y al tercer grupo “control positivo” se administró gemfibrozilo a la dosis de (4.5 mg/kg/día). Las concentraciones y dosis fueron determinadas por estudios experimentales preliminares.

La determinación de las pruebas bioquímicas para la medición de perfil lipídico (Colesterol Total, Triglicéridos, HDL y LDL-colesterol), se llevó a cabo en el estado basal, en el estado de hiperlipidemia; después de 15 días de tratamiento y finalmente una muestra sanguínea luego de 30 días de tratamiento.

Al realizar las pruebas estadísticas mediante el programa SPSS versión 22 se encontró que el extracto etanólico de chía en dosis de 1000 mg/kg/día disminuyó los niveles de colesterol total y triglicéridos en los distintos tiempos observados (a los 15 y 30 días de tratamiento) teniendo como control positivo al gemfibrozilo, no se observó disminución significativa en los mismos tiempos en comparación al control con relación a los niveles de LDL colesterol y el peso corporal a un nivel de confianza del 95%.

Para la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto se utilizó el método CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity), encontrándose que el extracto etanólico de chía tiene una capacidad antioxidante de 0.69 mmol Trolox/g de muestra.

ABSTRACT

This thesis aimed to evaluate the lipid-lowering effect of extracts of *Salvia hispanica* L. seed (chia), administered in experimental animals, and determination of antioxidant capacity in vitro.

To which was carried out the extraction of the active principles of *Salvia hispanica* L. seed (Chia), this was performed by continuous Soxhlet extraction equipment using three solvents of different polarity (petroleum ether, chloroform and ethyl alcohol), then the percentage yield of extracts was determined. Found 30% yield to the extract with petroleum ether, chloroform and 28.30% to 18.92% for ethyl alcohol.

Following the pilot test was to manage the different extracts was performed; at doses of 500 mg / kg / day and 1000 mg / kg / day to two groups of three experimental animals per type of solvent for 30 days, at the end of this period the triglyceride level was measured. The data were statistically analyzed by ANOVA (Analysis of Variance) and Tukey tests at a confidence interval of 95%. Where the extract obtained with ethyl alcohol at a dose of 1000 mg / kg / day had better effect in lowering triglycerides.

The latter extract (ethanol) was subjected to the Phytochemical preliminary analysis by the method of thin layer chromatography, in which terpenes, flavonoids, tannins and saponins were identified.

Considering the results of the pilot experimental final step was performed, to this 15 rats was used *Rattus norvegicus*. Which were divided into 3 groups of 5 animals each. The first group "negative control" no treatment is

administered, the second "treatment group" the dose of ethanol extract (1 g / kg / day) was administered to the third group and "positive control" was administered at a dose of gemfibrozil (4.5 mg / kg / day). Concentrations and doses were determined by preliminary pilot studies.

Determination of biochemical for measuring lipid profile (total cholesterol, triglycerides, HDL and LDL-cholesterol), testing was performed at baseline, in the state of hyperlipidemia; after 15 days of treatment and finally a blood sample after 30 days of treatment.

To perform statistical tests using SPSS version 22 program found that the ethanolic extract chia dose of 1000 mg / kg / day decreased the levels of total cholesterol and triglycerides at various times observed (at 15 and 30 days of treatment) as a positive control taking gemfibrozil, no significant decrease was observed in the same time compared to the control with respect to LDL cholesterol levels and body weight at a level of confidence of 95%.

The CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) method was used for the determination of antioxidant capacity in vitro of the extract was found that the ethanolic extract has an antioxidant chia 0.69 mmol capacity of Trolox / g of sample.

INTRODUCCIÓN

En nuestra actualidad por el estilo de vida y hábitos dietéticos las enfermedades relacionadas a los niveles de “grasas” en la sangre son muy frecuentes, cuando las personas hablan de colesterol como un problema médico, suelen referirse a un colesterol elevado. Pero este hecho reviste en realidad un trastorno sobre el perfil lipídico (LDL, HDL, triglicéridos y colesterol total), siendo destacable que la presencia de triglicéridos en elevadas cantidades aumenta el riesgo de enfermedad coronaria, por su parte el colesterol elevado incrementa el riesgo de paro cardíaco, ACV, entre otras complicaciones.⁽²³⁾

Por otra parte hace más de dos décadas se empezó a hablar de los radicales libres, sin embargo, tuvo que ser aceptado posteriormente por la medicina convencional como desencadenantes de enfermedad. Todas las moléculas y átomos tienen un grado de estabilidad iónica producido por los neutrones y protones del núcleo y los electrones de la corteza atómica o molecular. En algunos casos por razones diversas, los electrones de la corteza se encuentran excitados y cobran una enorme capacidad de reacción química con otros compuestos, lo que comporta una notable agresividad sobre la célula, especialmente su membrana. Factores como la contaminación, tabaco, infecciones o alimentos industrializados contribuyen con la formación de radicales libres, estos generan un proceso oxidativo que envejece y destruye las células, generando o contribuyendo con el desarrollo de muchas enfermedades. Evidentemente el “colesterol” elevado, por la naturaleza o composición de las grasas puede generar la formación de radicales libres.⁽²⁰⁾

Ante este problema la población recurre no solo a la medicina convencional, sino también a plantas medicinales, como la chía a quien atribuyen

efectos benéficos sobre el metabolismo de lípidos. ⁽⁴⁾ En el presente trabajo de investigación se ha realizado un estudio experimental con el fin de evaluar efecto de los extractos de la semilla de chía sobre la hiperlipidemia inducida en animales de experimentación y su capacidad antioxidante *in vitro*.

El presente trabajo comienza con los aspectos teóricos del problema de investigación, luego se exponen las metodologías utilizadas, posteriormente los resultados de la evaluación sobre el efecto hipolipemiante y de la capacidad antioxidante del extracto de chía. Para culminar con las conclusiones y sugerencias de la investigación.



OBJETIVOS

- ✚ Obtener un extracto de las semillas de *Salvia hispánica* L. (chía) con tres disolventes de distinta polaridad (alcohol etílico, cloroformo y éter de petróleo) y determinar el rendimiento de los mismos.
- ✚ Realizar una prueba piloto para elegir el disolvente que tenga el mayor efecto hipolipemiante y para establecer una posible dosis del extracto de las semillas de *Salvia hispánica* L. (chía) en ratas de laboratorio con hiperlipidemia inducida experimentalmente.
- ✚ Realizar el análisis fitoquímico preliminar del extracto obtenido en la prueba piloto mediante el método de cromatografía en capa fina.
- ✚ Comprobar el efecto hipolipemiante del extracto de las semillas de *Salvia hispánica* L. (chía) obtenido en la prueba piloto frente al fármaco Gemfibrozilo administrado por vía oral a ratas de laboratorio con hiperlipidemia inducida experimentalmente.
- ✚ Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto obtenido en la prueba piloto de las semillas de *Salvia hispánica* L. (chía) utilizando un estándar antioxidante “TROLOX”.

HIPÓTESIS

Si la población utiliza “para bajar el colesterol” la “chía” (*Salvia hispánica* L.) es probable observar un efecto positivo mediante la administración del extracto de esta planta a ratas de laboratorio con hiperlipidemia inducida experimentalmente.

Si además se ha descrito en la bibliografía que las semillas de “chía” (*Salvia hispánica* L.) contienen compuestos polifenólicos es probable que su extracto tenga capacidad antioxidante.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. *Salvia hispánica* L. (CHÍA)

1.1.1.ORIGEN Y ANTECEDENTES

La “chía” *Salvia hispánica* L. es una especie que pertenece a la familia de la lamiaceas, donde también se encuentran algunas plantas aromáticas como la menta, el tomillo, el romero y el orégano. Es una semilla nativa del sur de México y norte de Guatemala. El uso de la semilla y sus subproductos se remonta a la época de los Mayas y los Aztecas, quienes empleaban la semilla como alimento, medicina, ofrenda a los dioses y materia prima para producir un aceite que era empleado como base en pinturas decorativas y ungüentos cosméticos. En la actualidad, la semilla de chía se ha convertido en fuente de gran interés gracias a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, en especial el ácido alfa linolénico (omega-3), fibra, proteína y los antioxidantes. ^(1, 21)

1.1.2.SINONIMIA

- Kiosmina hispánica (1837)
- *Salvia neohispánica* (1898)
- *Salvia tetragona* (1794)
- *Salvia schiedeana* (1896)

1.1.3. CLASIFICACION TAXONÓMICA

La clasificación sistemática de la *Salvia hispánica* L. (chía) es la siguiente:

- **Reino:** Vegetal
- **División:** Angiospermas
- **Clase:** Dicotiledónea
- **Orden:** Lamiales
- **Familia:** Lamiáceas
- **Género:** *Salvia*
- **Especie:** *hispánica*
- **Nombre Científico:** *Salvia hispánica* L.⁽⁴⁰⁾

1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Salvia hispánica L. “chía”, es una planta herbácea anual; tiene hasta 1 m de altura.^(1, 3)

- **Tallos:** son ramificados con pubescencias cortas y blancas.
- **Hojas:** Opuestas con bordes aserrados miden 8-10cm de longitud y 4-6 cm de ancho. (Fig N°.1.1)
- **Flores:** Son hermafroditas, entre purpúreas y blancas, y brotan en racimos terminales. (Fig N°.1.1)
- **Fruto:** Son en forma de aquenio indehiscente cuya semilla es rica en mucílago, fécula y aceite; tiene unos 2mm de largo por 1.5mm de ancho, y es ovalada y lustrosa, de color pardogrisáceo a rojizo. (FigN°.1.2.)^(1,21)



Fig. N°1.1. *Salvia hispanica* L. “chía”



Fig. N°1.2. Semillas de *Salvia hispanica* L. “chía”

1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición química de la semilla es típicamente de proteínas (23.60%), carbohidratos (18.70%), lípidos (29.80%), vitaminas, minerales y fibra (18.00%)^(1, 21). Contiene todos los aminoácidos esenciales y es libre de gluten. Una de las características por la que más sobresale es por su contenido en ácidos grasos

esenciales, tal que su aceite contiene un 19% de ácido graso linoleico y un 63.8% de ácido graso alfa linolénico (omega-3).^(1, 21)

La semilla de chía contiene una cantidad de compuestos con potente actividad antioxidante, entre los más importantes se encuentran tocoferol y antioxidantes fenólicos tales como ácidos clorogénico, caféico y flavonoides (miricetina, quercetina y kaempferol).^(1, 21)

1.4. USOS TRADICIONALES

Las semillas de salvia hispanica L. (Chía tienen las siguientes propiedades:

- **Medicinales:** antioxidante, antiagregante plaquetario, antiinflamatorio, antimutagénico, anticarcinogenogénico, antiviral, laxante, hipotensor, hipocolesterolemiantes, hipoglucemiantes, inmuno estimulante, tónico cardíaco y nervioso, y alimento mineralizante, vitamínico y proteico^(1, 21)
- **Nutricionales:** harina de las semillas de chía sirve para la preparación de pan, destaca el valor refrescante y energético de las bebidas preparadas con chía, bebida elaborada con semilla entera, mezclada con agua, jugo de frutas, etc.^(1, 21)

1.5. CULTIVO

La chía es un cultivo que crece en condiciones tropicales y subtropicales, no es tolerante a las heladas. Por otro lado, los suelos donde mejor se desarrolla la planta son los arenosos, arcilloso de buen drenaje; como la mayoría de las salvias, es tolerante respecto a la acidez y a la sequía. Requiere abundante sol, y no fructifica en la sombra.^(1, 21)

1.6. LÍPIDOS

1.6.1. CONCEPTO

Los lípidos son un grupo heterogéneo de biomoléculas, insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos (Éter, cloroformo y otros). Se consumen en forma de aceite, mantecas, grasa, margarinas. ^(6, 24)

Los lípidos son un componente fundamental de la dieta, aportan la energía necesaria para desarrollar las actividades propias del organismo y las derivadas de la actividad física, representan la reserva energética del organismo (alrededor de 100.000 kilocalorías para un adulto de peso medio). Son almacenados en forma de tejido graso. ^(6, 24)

Además participan en la regulación metabólica (hormonas, vitaminas, prostaglandinas, etc.) y son también importantes componentes de las membranas biológicas (fosfolípidos y esteroides). ^(6, 24)

1.6.2. FUNCIONES DE LOS LÍPIDOS

- **ESTRUCTURAL:** Los lípidos son un componente importante de todas las membranas celulares y subcelulares (mitocondrial, nuclear, vacuolar, lisosomal, etc.) El tejido adiposo desempeña importantes funciones de relleno, amortiguadoras y de sostén; actúan como aislante térmico.
- **ENERGÉTICA:** La función más importante de los lípidos es la energética; se ha calculado que en promedio el 40% de las calorías que utiliza el organismo proviene de los lípidos.
- **TRANSPORTE:** Sirven también como un eficaz vehículo de sustancias liposolubles como vitaminas y hormonas y en esa forma regulan la actividad metabólica. Son además importantes en el transporte de materiales alimenticios como lipoproteínas. ^(6, 24)

1.6.3.PRINCIPALES LÍPIDOS PLASMÁTICOS

Los principales lípidos del plasma humano son:

Colesterol.

Esteres de colesterol.

Triglicéridos.

Fosfolípidos.

Ácidos grasos no esterificados. ^(6, 24)

1.6.4.COLESTEROL Y TRIGLICERIDOS

Los dos tipos más importantes de lípidos circulantes en la sangre son los triglicéridos y el colesterol. Su origen proviene de la alimentación y de la síntesis por parte del hígado. Ambos tipos cumplen diferentes misiones fisiológicas en el organismo, especialmente de tipo estructural y energético, pero cuando su producción es excesiva o su metabolismo deficiente la consiguiente acumulación puede constituir un importante factor de riesgo para el desarrollo de hiperlipidemia. ^(6, 24)

1.6.4.1 TRIGLICÉRIDOS (TRIACILGLICEROL)

Los triacilgliceroles o triglicéridos, son esteres de glicerina o glicerol y ácidos grasos, que constituye las reservas energéticas en mamíferos.

Son grasas que forman parte de nuestro organismo, siendo la principal forma química de almacenamiento, tanto en alimentos como en el organismo humano. En cantidades elevadas son perjudiciales, ya que pueden producir depósitos de grasa. Los triglicéridos son transportados en el plasma, en su mayor parte en forma de quilomicrones y VLDL, pero también están presentes en cantidades menores en LDL y HDL.

Están constituidos por una molécula de glicerol y tres ácidos grasos que pueden ser iguales o diferentes. Durante el proceso de digestión los triglicéridos son hidrolizados, quedando liberados los ácidos grasos en la luz intestinal. ^(6, 24)

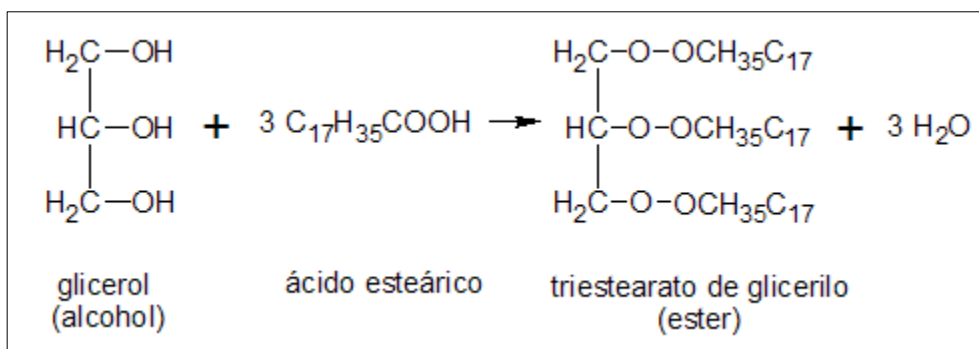


Fig. N° 1.4. FORMACIÓN DE TRIGLICÉRIDO.

1.6.4.1.1 FUNCIONES DE TRIGLICERIDOS

Los triglicéridos son las principales sustancias energéticas del organismo.

1.6.4.2 COLESTEROL

El colesterol se incluye dentro de una serie de sustancias, de gran importancia para el organismo, denominadas “Esteroides”. Los esteroides se caracterizan por presentar en su molécula un hidrocarburo cíclico denominado, ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano. ^(6, 24)

El colesterol posee dos sustituyentes metilo esenciales (C-18 y C-19), que están unidos al C-13 y C-10, respectivamente, y un doble enlace (C-5). Una cadena lateral hidrocarbonada ramificada está unida a C-17. Debido a que esta molécula tiene un grupo hidroxilo (unido a C-3) se clasifica como esterol. El colesterol normalmente se almacena dentro de las células en forma de éster de ácido graso. ^(6, 24)

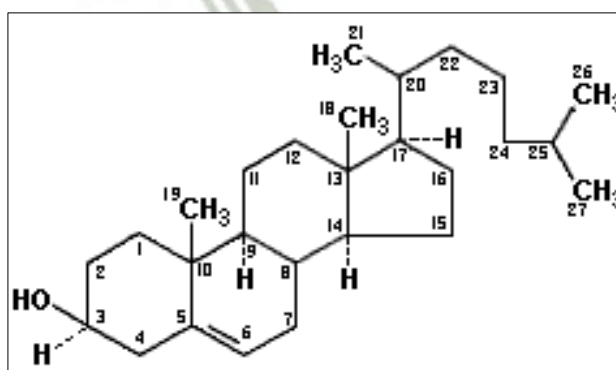


Fig. N° 1.5. ESTRUCTURA DEL COLESTEROL.

Está integrado por 3 lipoproteínas denominadas según la densidad. VLDL (13%) (VeryLowDensityLipoprotein) constituidas en un 52% por triglicéridos. Son materia prima para fabricar la fisiológica LDL (70%) (LowDensityLipoprotein). Por su baja densidad se deposita muy fácilmente en las capas íntimas arteriales y son las que forman la aterosclerosis. La HDL (17%) (High DensityLipoprotein). Conviene tenerla lo más elevada posible porque es la que interviene para remover la LDL de las arterias. ^(6, 24)

1.6.4.2.1 FUNCIONES DEL COLESTEROL

Las tres principales funciones del colesterol son:

- **Estructural:** Sirve como un componente esencial de las membranas (paredes celulares, órganos en las células), sin las cuales un conjunto configurado como es el cuerpo humano no podría existir ni funcionar.
- **Precursor:** Es la sustancia de partida para síntesis de distintas hormonas vitales de la corteza suprarrenales (corticosteroides) como cortisol y aldosterona, para las hormonas de las glándulas sexuales (estrógenos y andrógenos) y las vitaminas (grupo de la vitamina D).
- **Es el elemento constitutivo** de las sales biliares, sin el cual no podría tener lugar la digestión y absorción de las grasas nutritivas en el intestino delgado. ^(6, 24)

1.6.5.LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Las lipoproteínas son macromoléculas que contienen un núcleo hidrofóbico constituido por triglicéridos y colesterol esterificado y una cubierta externa conformada por compuestos antipáticos (fosfolípidos y colesterol libre) y en el interface diversas apoproteínas (Apo). Los fosfolípidos se disponen de tal manera que sus extremos cargados o hidrofílicos se encuentran interaccionando con el agua circulante, esto permite que los extremos no polares o hidrofóbicos puedan interactuar con moléculas tales como, los triglicéridos y el colesterol esterificado.

Las lipoproteínas tienen la función de solubilizar y transportar lípidos en el plasma.
(Fig. N°1.3)

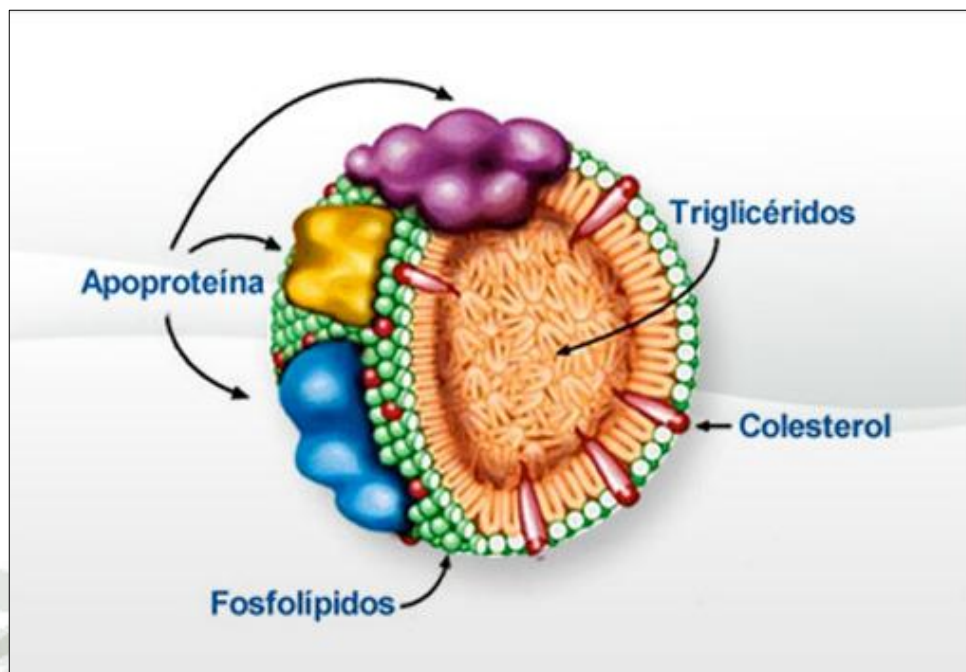


Fig. N° 1.3. ESTRUCTURA DE LIPOPROTEÍNA.

1.6.5.1 TIPOS DE LIPOPROTEÍNAS

Se han utilizado diversos métodos para su aislamiento y clasificación, existiendo 5 clases según su densidad en sentido creciente:

1.6.5.1.1 QUILOMICRONES

Partículas lipídicas gruesas, ricas en triglicéridos (exógenos), sin carácter aterogénico. Son sintetizados en el yeyuno y sólo están presentes en el período posprandial. Transportan los lípidos de origen alimentario por los linfáticos y después por la circulación. El aumento de quilomicrones y VLDL confiere al plasma un aspecto lechoso. ^(6, 24)

1.6.5.1.2 LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD (VLDL)

(Very Low-Density Lipoproteins, lipoproteínas prebeta). Están formadas por triglicéridos (75%) y colesterol (25%). Son sintetizadas en el hígado y

transportan el colesterol hepático hacia la periferia. Penetran en el interior de las células donde dejan su colesterol después de la degradación. ^(6, 24)

1.6.5.1.3 LIPOPROTEÍNAS DE DENSIDAD INTERMEDIA (IDL)

(Intermediary Density Lipoproteins) Proviene de la degradación de los triglicéridos (remanentes) en los vasos por la acción de la lipoproteína-lipasa fijada al endotelio vascular. ^(6, 24)

1.6.5.1.4 LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL)

(Low-Density Lipoproteins, β -lipoproteínas). Alrededor del 50% del colesterol es transportado en forma de LDL, cuya concentración guarda una correlación lineal con el riesgo de aterogenicidad. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), se encarga de llevar el colesterol a los distintos órganos. ^(6, 24)

1.6.5.1.5 LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL)

(High Density Lipoproteins, α -lipoproteínas) Formadas por fosfolípidos y apolipoproteínas A. Contienen una alta proporción de proteínas y menor concentración de colesterol y fosfolípidos. Depuran parcialmente el colesterol de los tejidos periféricos, transportándolo al hígado para su eliminación. ^(6, 24)

TABLA N°1. TRANSPORTE DE LIPOPROTEÍNAS

TIPO	ORIGEN	DESTINO	LÍPIDOS PRINCIPALES	FUNCIÓN
Quilomicrón	Intestino	Células	TG y colesterol dieta	Transporta lípidos de la dieta.
VLDL	Hígado	Células	TG y colesterol endógeno	Transporta lípidos endógenos.
LDL	Vasos (resto de VLDL)	Hígado y tej. periféricos	Colesterol endógeno	Transporta colesterol
HDL	Hígado e intestino	Hígado y células con alto uso de colesterol	Colesterol acumulado	Elimina y degrada el colesterol

FUENTE: Elaboración propia.

1.6.6.METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS

1.6.6.1 DIGESTIÓN DE LOS LÍPIDOS

La hidrólisis de los lípidos de la dieta a ácidos grasos, monoglicéridos, colina, etc., tiene lugar, casi exclusivamente, en el duodeno y yeyuno; en esas regiones intestinales existe un pH ligeramente alcalino (por la secreción de bicarbonato pancreático), contiene sales biliares y son el lugar de actuación de las lipasas pancreáticas. En duodeno, las sales biliares emulsionan las grasas, lo que unido a los movimientos peristálticos intestinales, posibilita que las grandes gotas de grasa del quimo alimenticio se dispersen en pequeñas gotas; esto hace que aumente hasta 10.000 veces la superficie de exposición de las grasa a las lipasas que actúan en duodeno y yeyuno. Los lípidos parcialmente digeridos, todavía insolubles en agua, forman micelas estables, compuestas básicamente por ácidos grasos de cadena larga, monoglicéridos y ácidos biliares. Las micelas difunden por la superficie de las células mucosales del intestino y liberan sus materiales constitutivos con el fin de que sean absorbidos. Los productos más polares de la digestión, tales como ácidos grasos de cadena corta, iones fosfato, colina, etc., difunden a través del medio acuoso. En el ser humano, la mayor parte de los triglicéridos se hidrolizan en monoglicéridos (2-acilgliceroles) y ácidos grasos, aunque también se forma algo de glicerol libre. Los fosfolípidos son totalmente hidrolizados o quedan como lisofosfolípidos (fosfolípidos desprovistos del ácido graso del carbono 2 del glicerol). Asimismo, el colesterol se desesterifica. ^(6, 24)

1.6.6.2 ABSORCIÓN DE LOS LÍPIDOS

El conjunto de ácidos grasos, monoglicéridos, iones fosfato, colesterol libre y otros elementos constitutivos de las grasas que se han formado en el proceso de digestión intestinal, se absorben por los enterocitos de la mucosa intestinal. La absorción se realiza por simple difusión, y transcurre, casi en su totalidad, en duodeno y yeyuno. Los ácidos biliares vertidos al intestino desde la vesícula biliar

con el fin de emulsionar las grasas del quimo alimenticio, son reabsorbidos principalmente en las regiones más distales del intestino. ^(6, 24)

Una vez en el interior de los citoplasmas de los enterocitos, los fosfolípidos y los ésteres del colesterol son resintetizados de nuevo; se unen con pequeñas cantidades de proteínas formando unos conglomerados lipídico-proteico, que reciben el nombre de quilomicrones, y que son vertidos al espacio extracelular, para pasar a continuación al sistema linfático. ^(6, 24)

Los quilomicrones son una de las formas en que los lípidos se encuentran en el plasma; todas ellas tienen una estructura común: un núcleo formado por triglicéridos y colesterol, y una porción exterior, en contacto con la fase acuosa del líquido extracelular, formada por fosfolípidos y proteínas. La proporción relativa de lípidos y proteínas en los quilomicrones (y, por tanto, las densidades correspondientes) varía en función del tipo de lipoproteínas presentes en los quilomicrones. Los ácidos grasos libres de cadena corta (con menos de 12 carbonos) pasan de los enterocitos a la circulación portal, y se transportan en sangre unidos a la albúmina: tales ácidos grasos pueden ser utilizados directamente por los tejidos como material energético. ^(6, 24)

1.6.6.3 TRANSPORTE DE LOS LÍPIDOS

1.6.6.3.1 VIA EXÓGENA

En la pared intestinal, los triglicéridos y el colesterol alimentarios son incorporados a quilomicrones que atraviesan los vasos linfáticos e ingresan en la circulación. Los quilomicrones contienen apolipoproteínas que, al activar la lipoproteína-lipasa en los capilares, liberan los ácidos grasos y los monoglicéridos incorporados a los quilomicrones. Los ácidos grasos atraviesan las células endoteliales y son almacenados en los adipocitos. Los quilomicrones residuales y el colesterol que contienen son reabsorbidos por el hígado. ^(6, 24)

1.6.6.3.2 VIA ENDÓGENA

Los triglicéridos y el colesterol sintetizados por el hígado son transportados en la circulación por las VLDL. Las apolipoproteínas que las recubren dirigen a las VLDL hacia los tejidos donde, al activar la lipoproteína-lipasa, liberan los triglicéridos. Las VLDL residuales regresan al hígado y son transformadas en LDL, que transportan el colesterol hacia los tejidos extrahepáticos (músculos, riñón, corteza suprarrenal). El colesterol no esterificado pasa de los tejidos al plasma y es incorporado a las HDL, que aseguran su regreso al hígado. ^(6, 24)

1.6.6.3.3 TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL

El colesterol procedente de la LDL modificada puede estar depositándose continuamente en determinadas estirpes celulares, incluso en condiciones consideradas como normales.

Por este motivo es necesaria la existencia de algún mecanismo que permita la eliminación del exceso de colesterol celular y concretamente su transporte hacia el hígado que es el único tejido capaz de eliminar netamente al colesterol del organismo. Este sistema de transporte “reverso” de colesterol es el que realiza la familia de lipoproteínas que conocemos con el nombre de HDL. ^(6, 24, 41)

1.6.7.COMPONENTES DEL PERFIL LIPÍDICO

Los lípidos provenientes de la dieta, sintetizados por el hígado o liberados por el tejido adiposo, deben ser trasladados hasta los tejidos que necesiten emplearlos, como los lípidos son insolubles en agua, el problema de cómo transportarlos se resuelve asociándolos con apolipoproteínas para constituir lipoproteínas. Existen 5 clases de lipoproteínas: quilomicrones, VLDL, IDL, LDL y HDL que junto al colesterol y triglicéridos forman el llamado perfil lipídico. ^(6, 24)

TABLA N° 2. PERFIL LIPÍDICO.

TIPO DE LÍPIDO	NIVEL SÉRICO (mg/dL)	
Colesterol Total	Deseable	<200
	Limítrofe alto	200-239
	Alto	>240
Colesterol LDL	Optimo	<100
	Limítrofe bajo	100-129
	Limítrofe alto	130-159
	Alto	160-189
	Muy alto	>190
Colesterol HDL	Bajo	<40
	Alto	>60
Triglicéridos	Normal	<150
	Levemente elevado	150-199
	Elevado	200-499
	Muy elevado	500

FUENTE: <http://www.intermedicina.com/Avances/clinica/ACL82.htm>

1.6.8.HIPERLIPIDEMIAS

1.6.8.1 SINONIMIA

Hiperlipoproteinemias, dislipidemias, dislipoproteinemias.^(24, 41)

1.6.8.2 DEFINICIÓN

Enfermedades congénitas o adquiridas caracterizadas por aumento de los lípidos y de las lipoproteínas del plasma.

1.6.8.3 CLASIFICACIÓN DE LA HIPERLIPIDEMIA

La clásica clasificación de Fredrickson divide a las hiperlipidemias en seis grupos según los patrones de aumento de lípidos y de lipoproteínas: I, IIa, IIb, III, IV y V. ^(24, 41)

TABLA N° 3. CLASIFICACIÓN DE FREDRICKSON DE LAS HIPERLIPIDEMIAS ESENCIALES

TIPO	LIPOPROTEINEMIA AUMENTADA	LÍPIDOS AUMENTADOS
Tipo I	Quilomicrones	Triglicéridos
Tipo IIa	LDL	Colesterol
Tipo IIb	LDL y VLDL	Colesterol y Triglicéridos
Tipo III	VLDL y residuos de quilomicrones	Triglicéridos y Colesterol
Tipo IV	VLDL	Triglicéridos
Tipo V	Quilomicrones y VLDL	Triglicéridos y Colesterol

FUENTE: vademécum clínico del diagnóstico al tratamiento.

1.6.8.4 SÍNTOMAS DE LA HIPERLIPIDEMIA

Generalmente ninguno y es por ello que se deben hacer estudios en personas aparentemente sanas. A veces la primera manifestación es un infarto cardiaco, cerebral, aterosclerosis o alguna otra consecuencia de los niveles altos de colesterol. ^(24, 41)

1.7. PROCESOS OXIDATIVOS Y ANTIOXIDANTE

1.7.1. RADICALES LIBRES Y METABOLITOS REACTIVOS

Radicales libres son átomos, moléculas o sus fragmentos, con uno o más electrones desapareados capaces de tener una existencia independiente por un corto tiempo. Pueden ser neutrales como tener un carácter aniónico o catiónico. ^(4, 20, 24)

Al poseer un electrón desapareado, son muy reactivos ya que tienden a robar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Esto causa la oxidación de las moléculas cuyo electrón fue robado, por lo que los radicales libres son llamados “oxidantes”. Así mismo, otros

metabolitos muy reactivos pueden ser formados a partir de radicales libres. A menudo, estos pueden ser más reactivos o tóxicos que sus moléculas madre. Pudiendo así, crearse reacciones en cadena que dan lugar a efectos biológicos lejos del sistema que originó el primer radical; un ejemplo constituye la peroxidación lipídica. ^(4, 20, 24)

Existen radicales libres derivados del oxígeno, nitrógeno o varios compuestos orgánicos. **(Ver la tabla N° 4)**

TABLA N° 4. PRINCIPALES RADICALES LIBRES EN EL ORGANISMO

TIPO	RADICAL LIBRE
Especies reactivas del oxígeno (ERO)	Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)
	Radical hidroxil (HO^{\bullet})
	Peróxido de hidrogeno(H_2O_2)
	Acido hipocloroso($HOCl$)
	Oxígeno singlete (1O_2)
	Ozono (O_3)
Especies reactivas del Nitrógeno	Nitróxido (NO^{\bullet})
	Dióxido de nitrógeno (NOO^{\bullet})
	Peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$)
Radicales orgánicos	Radical alcóxil (RO^{\bullet})
	Radical peróxil (ROO^{\bullet})

FUENTE: Avello M., Suwalsky M.: “RADICALES LIBRES, ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSA ANTIOXIDANTE CELULAR”. Universidad Concepción, 2006.

Los radicales libres se forman en reacciones bioquímicas de oxidación-reducción que ocurren en el metabolismo celular normal, muy influenciados por factores ambientales externos, tales como: ^(20, 24)

- Los componentes del humo del cigarrillo.
- Los contaminantes ambientales.

- Las radiaciones Gamma.
- La luz ultravioleta.
- Compuestos tóxicos.
- Dietas desbalanceadas.
- Dietas hipercalóricos e hiperlipídicas.
- Ejercicio o trabajo extenuante.

El efecto de los radicales libres en los sistemas biológicos depende mayormente de la presencia de oxígeno. Por un lado, el oxígeno es esencial para la vida porque su reducción a agua es fundamental para la síntesis de un compuesto energéticamente rico en el organismo: ATP (adenosin trifosfato). Por otro lado, el oxígeno puede ser una fuente de producción de metabolitos reactivos extremadamente tóxicos. Los radicales libres y metabolitos reactivos pueden reaccionar rápidamente con moléculas biológicamente importantes, como, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. ^(20, 24)

De este modo, es importante que la formación y efecto de los radicales libres en procesos fisiológicos este bajo el control de varios sistemas protectores, con el fin de evitar la actividad de los radicales libres en el lugar equivocado y dañar las propias moléculas importantes del cuerpo. ^(20, 24)

1.7.2.EFECTO NOCIVO DE LOS RADICALES LIBRES

El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas:

- **LÍPIDOS:** una de las biomoléculas más sensibles al ataque de las radicales libres son los ácidos grasos poliinsaturados, cuya lesión oxidativa se denomina peroxidación lipídica y que resulta especialmente relevante cuando afectan los lípidos constitutivos de las membranas biológicas, ya que se ven alteradas propiedades como fluidez, el potencial y la permeabilidad iónica de la membrana. ^(4, 20, 24)
- **PROTEÍNAS:** todas las proteínas son potenciales blancos de oxidación, los radicales libres pueden causar la fragmentación con la pérdida de la función de estas, alterándose su estructura y la consecuente pérdida de la función. ^(20, 24)

- **ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN):** ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN. Que activan genes. ^(20, 24)
- **CARBOHIDRATOS:** Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical HO[•] para producir sustancias reactivas. Así mismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas. ^(20, 24)

1.8. ANTIOXIDANTES

Un antioxidante se define habitualmente como “cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación a las de un sustrato oxidable, retrasa o impide significativamente la oxidación de ese sustrato”. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. ^(4, 20, 24)

La acción antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas funcionalmente más importantes (lípidos, proteínas, ADN, etc.). Y así mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante. Su acción se realiza tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. ^(4, 20, 24)

Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen. ^(4, 20, 24)

1.8.1. CLASIFICACION DE ANTIOXIDANTES

Clasificación de los antioxidantes, según origen:

TABLA N° 5. CLASIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES

EXÓGENOS	ENDÓGENOS	
	Enzimáticos	No Enzimáticos
Vitamina E	Superóxidodismutasa (SOD).	Glutación
Vitamina C	Catalasa (CAT).	Coenzima Q
Betacarotenos	Glutación peroxidasa (GPx)	Ac. Tioctico
Flavonoides		
Licopeno		

FUENTE: //hppt: Rev. Cubana Med. Milit. 2008; 31(2): 126-33.

1.8.1.1 POLIFENOLES

Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional. En general son sintetizados por una de estas dos vías biosintéticas: la ruta del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (o por las dos, por ejemplo los flavonoides). ^(4, 9, 20)

La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se presenta en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se puede producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es como glicósidos, siendo así solubles en agua. ^(4, 9, 20)

Los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura química básica, las que tienen mayor interés nutricional son:

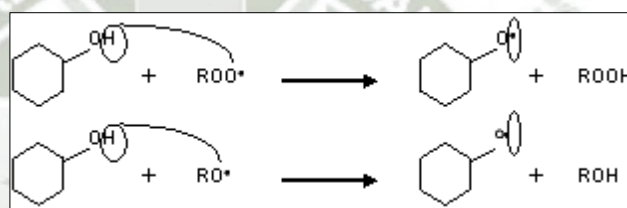
- Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenil acéticos.

- Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles.
- Lignanos y neolignanos.
- Flavonoides.
- Taninos.

1.8.1.1.1 Actividad Antioxidante de polifenoles

Los compuestos fenólicos protegen de la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) desempeñando un papel clave para prevenir la aterosclerosis. Inhiben la peroxidación lipídica y captan radicales libres como: hidroxilo, superóxido y alcoxil radical. La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo que contienen en su estructura. ^(4, 9, 20) (Fig. N° 1.7).

Fig. N° 1.7 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES.



FUENTE: <http://www.cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis.htm>

Numerosos estudios epidemiológicos relacionan que el consumo de alimentos de origen vegetal, ricos en estos compuestos, producen una menor incidencia de enfermedades relacionadas con procesos de oxidación (Diabetes mellitus, aterosclerosis, hipertensión, cáncer, problemas cardiovasculares, entre otros). ^(4, 9, 20)

1.9. FARMACOS HIPOLIPEMIANTES

Los fármacos hipolipemiantes o normolipemiantes disminuyen la concentración sanguínea de colesterol total, de colesterol LDL y/o de triglicéridos; algunos pueden aumentar la concentración sanguínea de colesterol HDL. ^(8, 15, 18)

1.9.1. CLASIFICACIÓN DE LOS FARMACOS HIPOLIPEMIANTES

- **Inhibidores de la HMG-CoA-reductasa:** Lovastatina, Simvastatina, Pravastatina, Fluvastatina, Atorvastatina y Rosuvastatina.
- **Derivados del ácido fenoxibutírico:** Clofibrato, Bezafibrato, Gemfibrozilo.
- **Resinas de intercambio aniónico o fijadoras de ácidos biliares:** Colestiramina
- **Ácido nicotínico (niacina).** ^(8, 15)

1.9.2. GEMFIBROZIL

1.9.2.1 FARMACODINÁMICA

El gemfibrozilo reduce las concentraciones plasmáticas de los triglicéridos (lipoproteínas de muy baja densidad-VLDL) y también en forma leve las de colesterol (lipoproteínas de baja densidad-LDL).

Estimulan el receptor activado por proliferados de peroxisomas (PPAR α), este receptor al ser estimulado consigue la regulación de genes de varias enzimas implicadas en el metabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos como las VLDL y de los quilomicrones, por lo que en conclusión estos medicamentos favorecen el catabolismo de las VLDL, reduciendo los niveles de triglicéridos en plasma y de forma inconstante el colesterol, sin embargo, tienen una acción pobre o nula sobre las LDL. ^(8, 15)

1.9.2.2 FARMACOCINETICA

Se absorbe bien en el tracto gastrointestinal. Se metaboliza en el hígado y se elimina por vía renal (70%) y fecal (6%). La vida media en dosis única es de 1,5

horas y en dosis múltiples, 1,3 horas. La reducción de las concentraciones de VLDL en plasma se evidencia en 2 a 5 días. ^(8, 15)

1.9.2.3 INDICACIONES

Coadyuvante del tratamiento en hiperlipidemia primaria severa (tipo IV), y al existir un riesgo significativo de enfermedad arterial coronaria que no ha respondido a la dieta o a otras medidas. Su empleo es limitado en las hiperlipidemias tipo II y III, debido a su efecto reducido sobre las concentraciones de colesterol. No es útil en el tratamiento de la hiperlipidemia tipo I. ^(8, 15)

1.9.2.4 POSOLOGÍA

Dosis usual adultos: 1,2g al día en 2 tomas, 30 minutos antes del desayuno y de la cena. No se ha establecido la dosificación en pediatría. Si después de 3 meses de tratamiento la respuesta es inadecuada, se debe interrumpir la terapéutica con gemfibrozilo, recomendando seguir una dieta con bajo contenido de lípidos. ^(8, 15)

1.9.2.5 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Es importante no ingerir más o menos medicación que la dosis indicada. Al evaluar la eficacia del tratamiento se tendrán presentes las variaciones estacionales en los niveles de lípidos (más elevados en invierno, menores en primavera y otoño). Dado que aumenta la excreción de colesterol en bilis, deberá interrumpirse el tratamiento si aparecen cálculos biliares. Se recomienda hacer estudios periódicos de la función hepática y suspender el fármaco si persisten alteraciones aumento de transaminasa glutámico-oxalacético (GOT), transaminasa glutámico-pirúvico (GPT), LDH y fosfatasa alcalina. Al comienzo del tratamiento

pueden aparecer disminución de la hemoglobina, leucocitos y hematócrito, que se estabilizan en el curso de la terapéutica. ^(8, 15)

1.9.2.6 CONTRAINDICACIONES

Cirrosis biliar primaria; deberá evaluarse la relación riesgo-beneficio en enfermedades de la vesícula biliar, cálculos biliares, disfunción hepática o renal severa. ^(8, 15)

1.9.2.7 REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS

Por lo general, son fármacos bien tolerados. Las más comunes son las gastrointestinales que se manifiestan por dolor abdominal, náuseas y diarrea. Está comprobada la capacidad litogénica biliar, duplicando la incidencia de litiasis biliar. También pueden provocar rash cutáneo, alopecia e impotencia. Si se asocian a estatinas, pueden aumentar el riesgo de rabdomiolisis. ^(8, 15)

1.9.2.8 INTERACCIONES

El uso simultáneo con anticoagulantes derivados de las cumarinas aumenta el efecto de éstos y puede disminuir el del ácido quenodexosídico, ya que aumenta la saturación de colesterol en bilis. ^(8, 15)

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio es de tipo experimental y corresponde al tipo de experimentos puros con grupo control y con pre y postprueba. ⁽¹¹⁾

2.1.2. UNIDADES DE ESTUDIO

2.1.2.1 Unidad vegetal

Para la ejecución del presente estudio la muestra vegetal fueron las semillas de *Salvia hispánica* L. (chía), adquiridas en un centro de abastos, donde regularmente adquiere la población para su consumo.

2.1.2.2 Unidad biológica

La muestra animal está constituida por 33 animales de experimentación correspondientes a la especie *Rattus norvegicus* (ratas albinas). Dieciocho de estos animales fueron para la prueba piloto y 15 para la prueba final. En general sus pesos corporales presentaban como promedio 252g, siendo el peso máximo de 274g y un peso mínimo de 238g. Sus edades fluctuaban entre 3 a 5 meses.

2.1.3.AMBITO GEOGRÁFICO Y TEMPORALIDAD

Este trabajo de investigación se desarrolló en el Bioterio, Laboratorio H-201 y en el Laboratorio de análisis clínico de la universidad Católica de Santa María durante los meses de marzo a julio del 2013.

2.2. MATERIALES DE LABORATORIO, EQUIPOS Y REACTIVOS

Material de vidrio

- Baguetas (Pirex)
- Capilares sin heparina (Marienfeld)
- Fiola de 10, 25, 50 mL (Pirex)
- Frasco de vidrio ambar con tapa rosca
- Pipetas graduadas de 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL
- Probetas graduadas de 100 mL (Pirex)
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitado de 100, 250 mL (Boeco)
- Varilla de vidrio

Equipos

- Balanza analítica: (SartoriusVerke).
- Baño María termostático (Vicking modelo Masson)
- Centrífuga 3000 r.p.m. (Rolco)
- Equipo de extracción continua Soxhlet
- Estufa eléctrica (Memmert)
- Espectrofotómetro (Shimadzu)
- Fotocolorímetro MICROLAB 200

- Lámpara UV
- Rotavapor (Buchi)

Fármacos

- Gemfibrozilo 600mg (FARMINDUSTRIA)

Reactivos

- Acetato de etilo (Merck, 99.5% pureza)
- Acetato de amonio (Merck)
- Ácido acético (Merck, 99.8% pureza)
- Ácido fórmico (Merck, 98.5% pureza)
- Ácido sulfúrico (Merck, 95.97% pureza)
- Agua destilada.
- Alcohol Etílico 96° (Delta Química, Q.P)
- Benceno (Merck)
- Cloroformo (Diproquim, Q.P)
- Cloruro de aluminio (Merck)
- Cloruro de cobre II dihidratado (Merck)
- Cloruro férrico (Merck)
- Éter de petróleo (Diproquim, Q.P)
- Kit de colesterol total (Valtek)
- Kit de HDL-Colesterol (Valtek)
- Kit de LDL-Colesterol (Valtek)
- Kit de Triglicéridos (Valtek)
- Metanol (Merck, Q.P)

- Neocuproina
- Reactivo de Dragendorft
- Rvo. de Lieberman Burchard
- Trolox (6-hydroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) (Merck)

Otros

- Eppendorfs
- Espátulas
- Gradilla para tubos de ensayo
- Guantes de latex
- Jeringas de tuberculina
- Malla de asbesto
- Mortero de porcelana
- Micropipeta automática 25-250 µL
- Pinzas para soporte
- Papel filtro
- Sonda orogástrica
- Soporte universal
- Trípodes

2.3. MÉTODOS

2.3.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *SALVIA HISPÁNICA* L. (CHÍA)

2.3.1.1 Molienda

Previo a obtener el extracto fue necesario la trituración de las semillas de chía, para favorecer el proceso de extracción, la trituración fue manual, utilizando un mortero de porcelana, llevando las semillas a un grado de trituración de moderado a fino.



Fig. N° 2.1 Trituración de semillas *Salvia Hispánica* L (chía)

2.3.1.2 Extracción con equipo de Soxhlet

Es un sistema de extracción sólido-líquido en el que la extracción se realiza en un aparato que consta de un balón o matraz, un cuerpo extractor o tubo de extracción y un refrigerante.

El Soxhlet es un aparato diseñado para realizar una extracción continua pero en la que se reutiliza el disolvente. Se escoge un solvente que selectivamente disuelva los componentes deseados. El sólido que se va a extraer se coloca en un cartucho hecho de papel filtro, tela o fibra de vidrio. Este se inserta en el cuerpo extractor. Un disolvente orgánico de bajo punto de ebullición, por ejemplo éter dietílico o alcohol etílico se coloca en un matraz de fondo redondo y se calienta

hasta reflujo. Los vapores suben por el tubo y al llegar al refrigerador se condensa y cae sobre el cartucho que contiene la droga. Este se va empapando con el disolvente hasta que llega al nivel y entonces desciende por el tubo y el solvente, el cual contiene el compuesto deseado disuelto, se regresa dentro del balón de destilación para ser reutilizado. El ciclo-vaporización-condensación-extracción-evacuación por el tubo, se repite varias veces, y el producto deseado se concentra en el matraz. ⁽⁴²⁾

- **Procedimiento realizado:** se procedió a empaquetar 12g de material vegetal en una hoja de papel filtro y se colocó al equipo soxhlet, en el balón se colocaron 150 mL del disolvente (éter de petróleo, cloroformo y alcohol etílico) se llevó a baño maría controlando que la temperatura no excediera el punto de ebullición del disolvente.
- **Extracción con etanol:** se realizó por aproximadamente siete a ocho horas a una temperatura de 78°C siendo este el punto de ebullición de este disolvente.
- **Extracción con cloroformo:** se realizó por aproximadamente cinco a seis horas a una temperatura de 61°C siendo este el punto de ebullición del disolvente.
- **Extracción con éter de petróleo:** se realizó por aproximadamente dos a tres horas a una temperatura de 50-70° siendo este el punto de ebullición de este disolvente.

El extracto obtenido lo concentramos eliminando la mayor cantidad de disolvente, se usó el rotavapor (alcohol etílico), en el caso de cloroformo y éter de petróleo se evaporo a baño maría, hasta obtener un extracto blando el cual se pesó y se guardó protegido de la luz.

• Cálculos del porcentaje de rendimiento

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{peso del extracto seco}}{\text{peso de planta seca}} \times 100$$



Fig. N° 2.1 Extracción de semillas *Salvia Hispanica* L (chía).

2.4. ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

En esta etapa del trabajo permitirá identificar los principales grupos de metabolitos presentes en el extracto de las semillas de *Salvia hispanica* L. “chía”.

2.4.1. IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina (CCF o TLC-sigla en inglés) es una forma de cromatografía de adsorción sólido-líquido que constituye una técnica importante en química orgánica para el análisis rápido de pequeñas cantidades de muestras. Esta técnica tiene utilidad cualitativa más no cuantitativa, así que frecuentemente se usa para la simple detección cualitativa de un componente en una mezcla. ⁽³²⁾

Los adsorbentes (o fases estacionarias) más utilizados en la cromatografía de capa fina son: sílica gel (este se utiliza en el 50% de las separaciones), óxido de aluminio o alúmina ácida, neutra o básica, celulosa y poliamidas.

Se usan como soporte de adsorbente, láminas de vidrio, plástico o metálicas (por ejemplo aluminio). Los tamaños de la placa para CCF convencional son: 20x20, 10x20 y 5x2. Hay placas que contienen un indicador de fluorescencia el

número que aparece como subíndice nos indica la longitud de onda a la cual se hace visible el indicador utilizado. ⁽³²⁾

La muestra se aplica con un capilar sobre la placa; el desarrollo de la placa es un proceso mediante el cual la muestra es transportada a través de la fase estacionaria por la fase móvil. ⁽³²⁾

Si la muestra (ó mancha) no es coloreada, se requiere de métodos que nos permitan visualizar el o los componentes presentes. También se conoce este procedimiento como revelado. Estos métodos son: químicos (por inmersión o rociado) o físicos (ópticos). Se utiliza radiación ultravioleta si los compuestos absorben activamente esta radiación. ⁽³²⁾

2.4.2.PROCEDIMIENTO REALIZADO

Como material de estudio se utilizó el extracto obtenido con el disolvente alcohol etílico, ya que este tuvo mejor efecto hipolipemiante en la prueba piloto (ver resultados).

Se procedió a cortar placas de sílica gel con dimensiones de 10x5cm y trazamos delicadamente con lápiz dos márgenes: superior e inferior, cada uno a 1cm del borde de la placa. Sobre la línea de la base inferior sembramos en banda, con los capilares pequeñas cantidades de muestra, dejando secar bien antes de la siguiente siembra.

Secar bien la placa y colocarla en la cuba cromatográfica con su respectiva fase móvil (previamente saturada 30 min antes), dejar correr la fase móvil hasta 1cm antes del borde superior.

Retirar la placa de la cuba cromatográfica, dejar secar para una correcta identificación de componentes, en algunos casos se utilizaron reveladores químicos, y uso de lámpara de luz UV. Finalmente se determinó los valores de Rf para cada componente identificado.

2.4.2.1 Corrida general

Para esta determinación se utilizó como fase móvil n-hexano-Acetona (8:2), la detección se realizó con Ácido sulfúrico 10% en etanol: En donde se espera la aparición de bandas de varios colores indican la presencia metabolitos secundarios. ⁽²⁹⁾

2.4.2.2 Identificación de Saponinas

Para esta determinación de saponinas se utilizó como fase móvil Metanol 100 mL, la detección se realizó con reactivo Liebermann-Burchard: UV 365 nm en donde se espera la aparición de bandas azul, verdes y/o bandas rosadas a rojas. ⁽⁹⁾

2.4.2.3 Identificación de Flavonoides

Para esta determinación de flavonoides se utilizó como fase móvil: acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético/agua (100:11:11:27), la detección se realizó con tricloruro de aluminio 10% en etanol: UV 365 nm donde se espera la aparición de manchas fluorescentes amarillas. ⁽²⁹⁾

2.4.2.4 Identificación de Taninos

Para esta determinación de taninos se utilizó como fase móvil acetato de etilo-metanol (80:20), la detección se realizó con cloruro férrico 10% en etanol: en donde se espera la aparición de bandas marrón verdoso y/o bandas azul a negros. ⁽⁹⁾

2.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOLIPEMIANTE

2.5.1. ESTANDARIZACIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales de experimentación antes de iniciar la evaluación, fueron sometidos a un proceso de adaptación bajo las mismas condiciones ambientales y alimenticias. Recibieron dieta habitual (maíz, cebada, trigo, agua) en las mismas cantidades antes de la investigación y posterior a la inducción (administración de dieta hipercalórica).



Fig. N° 2.3 Dieta habitual de los animal de experimentación

2.5.2. DIETA HIPERCALÓRICA CON ALTO CONTENIDO EN LÍPIDOS

Para la inducción a un estado hiperlipidémico, fue necesaria la administración de una dieta hipercalórica con alto contenido en lípidos, cuya composición fue la siguiente:

TABLA N° 6 DIETA HIPERCALÓRICA.

Alimento	Colesterol (mg)	Cal
Harina	1480	352
Huevo entero	504	155
Seso de res	2200	120
Manteca de cerdo	106	630

FUENTE: ELABORACION PROPIA.



Fig. N° 2.3 Dieta hipercalórica de los animales de experimentación

2.5.3.OBTENCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA

La extracción de la muestra sanguínea (1.0 mL aprox.) se obtuvo en ayunas, mediante el método de Dartman, que utiliza la punción capilar a nivel del ángulo interno del ojo, las muestras son recolectadas y rotuladas en envases con cierre hermético (Eppendorf).



Fig. N° 2.4 Obtención de muestra sanguínea.

Posteriormente las muestras de sangre se llevan a una centrifuga de tubos Eppendorf a 3000 r.p.m, durante 5 minutos, con el fin de obtener el suero límpido y sin hemólisis. Estos sueros se transfirieron con la ayuda de una micropipeta, a unos tubos rotulados y esterilizados, para la realización de las pruebas bioquímicas correspondientes.

Culminado la extracción sanguínea y la centrifugación se lleva acabo los diferentes análisis enzimáticos para determinar los factores del perfil lipídico.



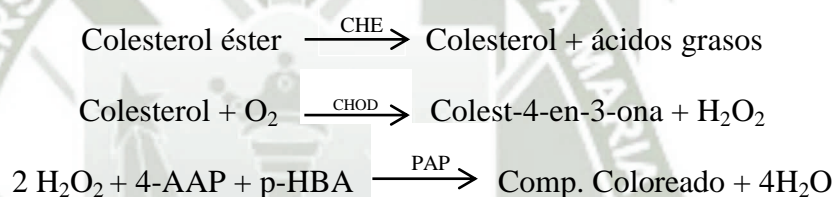
Fig. N° 2.5 centrifugación de muestra sanguínea.

2.5.4.MEDICIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO

El perfil lipídico (colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL colesterol) fue medido en los animales de experimentación antes de la dieta hipergrasa, en el estado de hiperlipidemia y a los 15 y 30 días de administrado el tratamiento, siguiendo los siguientes métodos.

2.5.4.1 Determinación del colesterol total

El colesterol total se determina por acción de las enzimas Colesterol Ester hidrolasa (CEH) y Colesterol oxidasa (CHOD) la primera libera el colesterol de los esteres de colesterol, y la segunda oxida el colesterol libre produciéndose peróxido de hidrogeno, el cual en presencia de la enzima peroxidasa (PAD) reacciona con el sistema cromogénico dando origen a un compuesto coloreado en cantidad proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra que absorbe a 505nm.



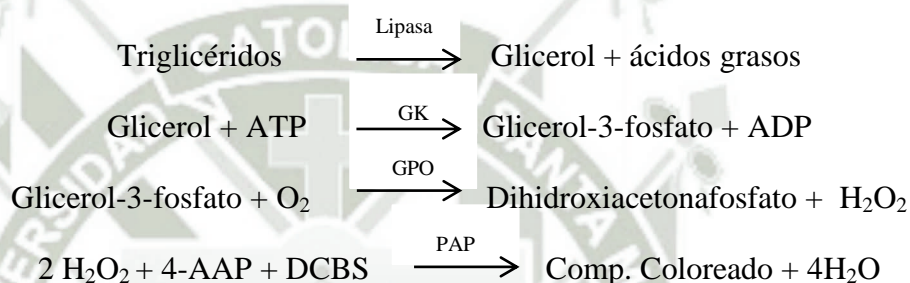
Para la determinación del colesterol total se utilizara el procedimiento a continuación:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar		0.01mL	
Muestra (suero)			0.01 mL
Reactivo de trabajo	1.00 mL	1.00 mL	1.00 mL

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o a 10 minutos a temperatura ambiente (>20°C). Leer las absorbancias llevando a cero el fotocolorímetro con el blanco de reactivo. El color resultante es estable por lo menos treinta minutos.

2.5.4.2 Determinación de triglicéridos

Los triglicéridos son hidrolizados por una lipasa específica liberando ácidos grasos y glicerol. El glicerol es fosforilado por la enzima gliceroquinasa (GK) y posteriormente, el glicero-1-fosfato es oxidado a dihidroxiacetona fosfato por la enzima glicerol-fosfato oxidasa (GPO), generándose peróxido de hidrogeno. Posteriormente, el peróxido de hidrogeno reacciona con 4-Amino-Antipirina (4-AAP) y el ácido 3,5-Dicloro-2-Hidroxibencesulfónico (DCBS) para producir por medio de la enzima peroxidasa un compuesto coloreado en cantidad proporcional a la concentración de triglicéridos presente en la muestra, midiéndose la absorbancia a 520nm.



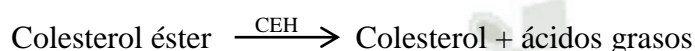
Para la determinación de triglicéridos se utilizara el procedimiento a continuación:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar		0.01 mL	
Muestra (suero)			0.01 mL
Reactivo de trabajo	1.00 mL	1.00 mL	1.00 mL

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o a 10 minutos a temperatura ambiente (>20°C). Leer las absorbancias llevando a cero el fotocolorímetro con el blanco de reactivo. El color resultante es estable por lo menos treinta minutos.

2.5.4.3 Determinación HDL-Colesterol

El HDL-Colesterol es obtenido mediante precipitación de las lipoproteínas LDL y VLDL en presencia de cloruro de magnesio y ácido fosfotungstico, quedando el primero en solución. Luego el HDL colesterol en solución se determina por acción de las enzimas colesterol éster hidrolasa y colesterol oxidasa. La primera libera ésteres de colesterol y la segunda oxida el colesterol libre produciéndose peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de la enzima peroxidasa reacciona con el sistema cromogénico dando lugar a un compuesto coloreado que absorbe a 550nm.



Para la determinación de HDL-colesterol se utilizara el procedimiento a continuación:

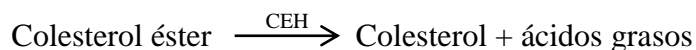
	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar		0.01 mL	
Muestra (suero)			0.01 mL
Reactivo de trabajo	1.00 mL	1.00 mL	1.00 mL

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o a 10 minutos a temperatura ambiente (>20°C). Leer las absorbancias llevando a cero el fotocolorímetro con el blanco de reactivo. El color resultante es estable por lo menos treinta minutos.

2.5.4.4 Determinación LDL-Colesterol

El LDL-Colesterol es obtenido precipitando selectivamente, mediante el uso de heparina, en una solución con el punto isoeléctrico adecuando, quedando en solución los colesteroles HDL y VLDL. El LDL-Colesterol precipitado se determina obteniendo el diferencial entre el colesterol total y los colesteroles HDL y VLDL que permanecen en solución por acción de las enzimas

colesterol hidrolasa y colesterol oxidasa que actúan sobre esto últimos. La primera libera el colesterol de los esteres de colesterol y la segunda oxida el colesterol libre produciéndose peróxidos de hidrogeno, el cual en presencia de la enzima peroxidasa reacciona con el sistema cromogénico dando lugar a un compuesto coloreado que absorbe a 550nm.



Para la determinación de LDL-Colesterol se utilizara el procedimiento a continuación:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar		0.01 mL	
Muestra (suero)			0.01 mL
Reactivo de trabajo	1.00 mL	1.00 mL	1.00 mL

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o a 10 minutos a temperatura ambiente (>20°C). Leer las absorbancias llevando a cero el fotocolorímetro con el blanco de reactivo. El color resultante es estable por lo menos treinta minutos.



Fig. N° 2.7 Fotocolorímetro para la determinación del perfil lipídico.

2.6. PRUEBA PILOTO DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE

Después de realizar la obtención de los extractos: etanólico, clorofórmico y éter de petróleo de las semillas de *Salvia hispánica* L. “chía” se procedió a llevar a cabo una prueba piloto que tuvo como objetivo determinar qué tipo de disolvente disminuye de manera significativa los niveles séricos de triglicéridos y además sirvió para determinar una dosis inicial, partiendo de dos dosis: 500 mg/kg y 1000mg/kg, determinadas por estudios experimentales preliminares.^(17, 19)

Una vez estandarizadas las condiciones ambientales, alimenticias, se procedió a formar 3 grupos, cada grupo estuvo formado por 6 ratas estas se distribuyeron aleatoriamente conforme el tabla N°7, se procedió a medir el nivel de triglicéridos en estado basal. Posteriormente se les administró la dieta hipercalórica con alto contenido en lípidos durante 15 días.

Luego de este periodo se midió el nivel de triglicéridos, se administraron los tratamientos a las dosis respectivas, durante 1 mes y al término de la administración de los tratamientos se procedió a medir el nivel de triglicéridos.

TABLA N° 7 FORMACIÓN DE GRUPOS PARA LA PRUEBA PILOTO

Grupo	Tratamiento	Dosis	N° animales
GP1	Extracto de chia con éter de petróleo	500 mg/kg	3
GP2		1000 mg/kg	3
GP3	Extracto de chia con cloroformo	500 mg/kg	3
GP4		1000 mg/kg	3
GP5	Extracto de chia con alcohol etílico	500 mg/kg	3
GP6		1000 mg/kg	3

FUENTE: Elaboración propia

2.7. PRUEBA FINAL DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE

Una vez establecida la naturaleza del disolvente para la obtención del extracto de chía y su dosis, se procedió con la evaluación final.

Para esta prueba se usaron 15 ratas se distribuyeron aleatoriamente conforme el **Tabla N° 8**. Y fueron marcados respectivamente, se registraron los pesos corporales, se procedió a medir su perfil lipídico en estado basal (colesterol total, triglicéridos, HDL-colesterol y LDL-colesterol), posteriormente se les administró la dieta hipercalórica con alto contenido en lípidos durante 15 días, luego de este periodo se midió el perfil lipídico, se administraron los tratamientos durante un mes al término de este periodo se volvió medir el perfil lipídico (colesterol total, triglicéridos, HDL-colesterol y LDL-colesterol).

TABLA N° 8 FORMACIÓN DE GRUPOS PARA LA PRUEBA FINAL.

Grupos		Dosis	N° animales
Grupo tratamiento	Extracto etanólico	1 g/kg/día	5
Control positivo	Gemfibrozilo	4.5 mg/kg/día	5
Control negativo	-----	-----	5

FUENTE: Elaboración propia.



Fig. N° 2.9 Administración de los tratamientos

2.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

2.8.1. Método CUPRAC

Existen diversos métodos que permiten evaluar la capacidad antioxidante de muestras naturales o sintéticas. Se ha elegido el método de CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity).

Este método utiliza el Cu^{+2} y la Neocuproína, para reaccionar con el compuesto en estudio formando un quelato coloreado de Cu^{+1} : $[\text{Cu}^{+1}\text{-Nc2}]^{+1}$, el cual es soluble en agua y en medios orgánicos. Esta reacción se lleva a cabo a pH controlado por buffer acetato de amonio. El quelato formado con el cobre reducido es medido a 450nm, la formación de este complejo se completa en 30 minutos. Sin embargo antioxidantes de reacción lenta necesitan de incubación a temperatura elevada para completar su oxidación (50°C por 20 minutos).^(5, 28)

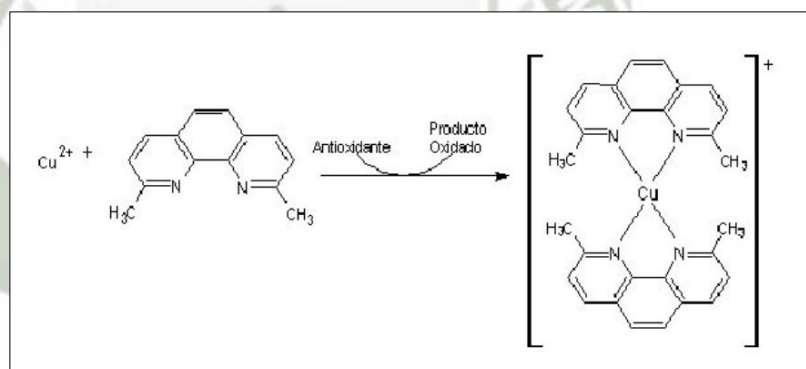


Fig. 2.10. Mecanismo de acción del método CUPRAC

2.8.1.1 Reactivos a preparar

- ✚ Cloruro de Cobre Dihidratado: Solución de $1 \times 10^{-2}\text{M}$ en etanol.
- ✚ Neocuproína: Solución 7.5 mM en etanol
- ✚ Acetato de Amonio: solución buffer 1 M a pH 7
- ✚ Extracto etanólico de “chía”: 1.031% P/V en etanol
- ✚ Trolox: solución 10mM en etanol.

2.8.1.2 Curva de Calibración de Trolox

Se preparó el grafico estándar con un patrón de referencia para asegurarnos que los resultados obtenidos para nuestras muestras sean confiables. Para la realización del grafico estándar, se utilizó como estándar Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), análogo hidrosoluble de la vitamina E, por su alta estabilidad.

- ✚ La curva estándar para el método de CUPRAC, fue elaborada para las corridas que se hizo, para lo cual se preparó una solución madre del Trolox.
- ✚ Se preparó una solución madre de Trolox de concentración 10 mM, a partir de la cual se hicieron diluciones para obtener las soluciones de trabajo de 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M, 600 μ M respectivamente.

2.8.1.3 Preparación de la solución madre

Se pesa 12.51 mg de Trolox y se lleva a una fiola de 5 mL, completando el volumen con etanol. Esta solución se conserva bajo refrigeración.

PM Trolox= 250.3 g/mol

$$\frac{12.5\cancel{\text{mg}}}{5\cancel{\text{mL}}} \times \frac{1\cancel{\text{mmol}}}{250.3\cancel{\text{mg}}} \times \frac{1000\cancel{\text{mL}}}{1\text{L}} = 10\text{mM} \quad \text{Ec.1.}$$

2.8.1.4 Procedimiento realizado

- ✚ Se dispuso de una batería de 7 tubos y se colocó en cada uno de ellos las siguientes soluciones en el orden mencionado 1 mL de la solución de cloruro de cobre, 1 mL de buffer acetato de amonio, 1 mL de la solución de Neocuproína.
- ✚ Se añadió 0.5 mL, 1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL, 2.5 mL, 3.0 mL de la solución de Trolox a los tubos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente, con excepción del blanco.

- Agua destilada 3.0 mL, 2.5 mL, 2.0 mL, 1.5 mL, 1.0 mL, 0.5 mL excepto al tubo numero 6 (se observa en el Tabla N° 9).

TABLA N° 9 PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE SOLUCIÓN TROLOX 10mM.

Reactivos	Tubos de Ensayo						
	Blanco	1	2	3	4	5	6
CuCl₂	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Buffer	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
CH₃COONH₄							
Neocuproína	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Trolox 10mM	-	0.5 mL	1.0 mL	1.5 mL	2.0 mL	2.5 mL	3.0 mL
Agua destilada	3.0 mL	2.5 mL	2.0 mL	1.5 mL	1.0 mL	0.5 mL	-

FUENTE: Elaboración propia.

- Se dejó reposar la batería de tubos a temperatura ambiente y en la oscuridad por 30 minutos.
- Se leyeron las absorbancias a 450nm en el espectrofotómetro.

2.8.1.5 Ensayo con la muestra

Para proceder a determinar la capacidad antioxidante de la muestra se hizo el mismo procedimiento de la Tabla anterior, donde en lugar de adicionar Trolox se utiliza el extracto etanólico de la muestra (por triplicado) a partir de una solución madre de 0.1031 g en 10 mL de etanol, lo que corresponde a una concentración del 1.031%. de esta solución madre, las alícuotas crecientes de muestra. Estas fueron leídas en el espectrofotómetro contra un blanco a 450 nm previa exposición a una temperatura ambiente y en oscuridad por 30 minutos.

2.9. ANALISIS ESTADISTICO

Promedio o media aritmética

Se obtiene sumando todos los valores individuales $\sum(n)$ y dividiendo el número de valores (n) .⁽¹⁴⁾

$$\bar{x} = \frac{\sum(n)}{n}$$

Desviación estándar

O desviación típica es una medida de dispersión para variables de razón y de intervalo, de gran utilidad en la estadística descriptiva. Es una medida que informa de la media de distancias que tienen los datos respecto a su media aritmética, expresada en las mismas unidades que la variable⁽¹⁴⁾. Por definición la desviación estándar es:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x} - x)}{n - 1}}$$

Análisis de varianza factorial

El análisis de varianza factorial permite estudiar la interacción de una variable dependiente respecto de dos factores que influyen en ella.⁽¹³⁾

Test de Tukey

Es una prueba de comparación múltiple, utiliza medias graduales, se basa en el análisis de varianza factorial y asegura que la probabilidad de una o más comparaciones que se juzgue significativa solamente por azar no sea mayor de 5%, es decir, si el análisis de varianza factorial de los resultados obtenidos fueran significativos a los diferentes tratamientos, se procederá averiguar estadísticamente cuál de ellos fue más eficiente.⁽¹⁴⁾

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. OBTENCIÓN DE LAS SEMILLAS DE “CHÍA” Y EXTRACTOS

El presente estudio comenzó con la obtención del producto fitoterapéutico (*Salvia hispánica* L.), para ello se adquirieron 500g de las semillas de chía, las que se observaron y se concluyó que estaban en buenas condiciones de conservación. Estas semillas fueron trituradas conforme el método descrito a un grado moderado a fino, posteriormente se sometió a extracción con equipo Soxhlet utilizando tres disolventes de diferente polaridad, éter de petróleo, cloroformo y alcohol etílico.

Posteriormente los tres productos extractivos se concentraron eliminando la mayor cantidad de disolvente, se usó el rotavapor (Etanol), en el caso de cloroformo y éter de petróleo se evaporó a baño maría, obteniendo tres extractos blandos, cuyos rendimientos se muestran a continuación:

Como observamos en la **Tabla N°1** los más altos porcentajes de rendimiento son con los disolventes éter de petróleo y cloroformo (30.0% y 28.3% respectivamente), y el extracto etanólico es el que presentó menor rendimiento (18.92%). En el caso de mayor rendimiento los componentes de la semilla de chía tuvieron mayor afinidad por tales disolventes orgánicos apolares, este rendimiento más alto no solo podría deberse a la extracción de principios activos con capacidad hipolipemiante y antioxidante (polifenoles) de la planta, sino también a la presencia de lípidos, grasa y ceras que podrían estar presente en el extracto blando, dando

como resultado un mayor rendimiento. (Ver Fig. 3.1); mientras que el extracto obtenido con alcohol etílico (polar) tuvo menor rendimiento.

Tabla N°1

Rendimiento de la extracción de “chía” mediante Soxhlet con tres disolventes de diferente polaridad

Disolvente	Cloroformo	Éter de petróleo	Alcohol etílico
Semillas (g)	12 g	12 g	12 g
Extracto blando (g)	3.4 g	3.6 g	2.7 g
Rendimiento (%)	28.30	30.00	18.92

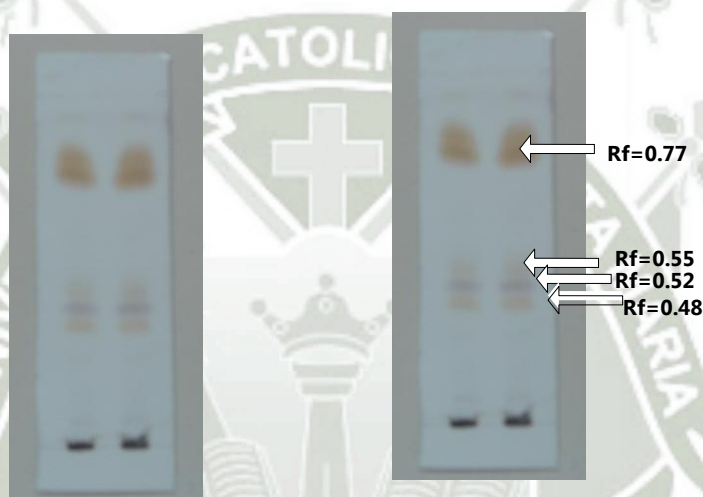
FUENTE: Elaboración propia.



Fig. 3.1 Extractos de semillas de “chía” obtenidos con Éter de Petróleo, Cloroformo y Alcohol Etílico respectivamente.

3.2. ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR: CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina del extracto etanólico de *Salvia hispánica* L. “chía”, se realizó con el objetivo de identificar algunos de los principales metabolitos secundarios que serían los responsables del efecto fitofarmacológico. Con tal objeto primero se realizó una corrida general, para luego realizar reacciones de identificación para metabolitos en particular.



Placa cromatográfica para la Corrida General

La placa cromatografía para la corrida general que utilizó como fase móvil hexano y acetona, y como revelador ácido sulfúrico en etanol; muestra en detalle las bandas correspondientes a sustancias terpénicas, se observan manchas de color azul (Rfs de 0.77, 0.52), color verde (Rf=0.55, 0.48).



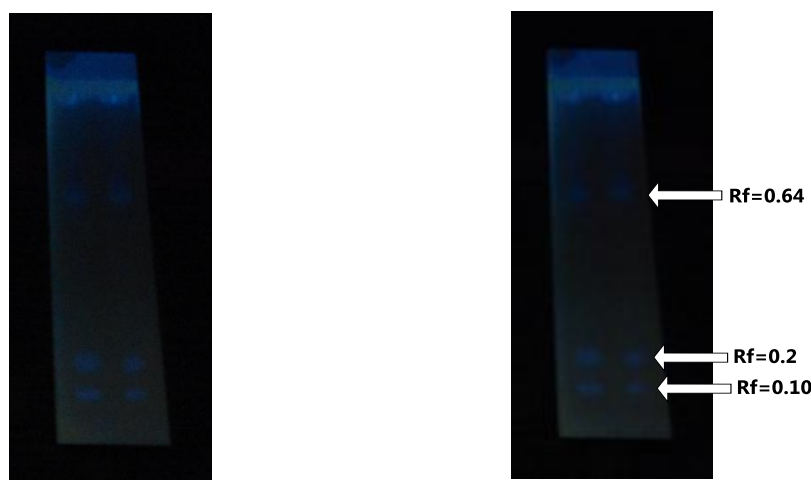
Placa cromatográfica para la identificación de saponinas

La placa cromatografía para saponinas que utilizó como fase móvil metanol y como revelador al reactivo de Liebermann Burchard muestra en detalle las bandas correspondientes este tipo de metabolitos, se observan manchas rosas (Rfs de 0.87, 0.80, 0.76, 0.68, 0.54, y 0.22)



Placa cromatográfica para la identificación de taninos

La placa cromatografía para taninos que utilizó como fase móvil una mezcla de metanol y agua, y como revelador cloruro férrico en etanol; muestra en detalle las bandas correspondientes este tipo de metabolitos, se observan manchas marrón verdosas (Rfs de 0.83, 0.21 y 0.11)



Placa cromatográfica para la identificación de flavonoides

La placa cromatografía para flavonoides que utilizó como fase móvil una mezcla de acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico y agua, y como revelador al reactivo de cloruro de aluminio, muestra en detalle las bandas correspondientes este tipo de metabolitos, se observan manchas azul turquesa (Rfs de 0.64, 0.20 y 0.10)

3.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE

3.3.1. PRUEBA PILOTO DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE

Previo a la realización de la experimentación final para evaluar el efecto hipolipemiante de las semillas de chía, se realizó una prueba piloto, que fue necesaria para determinar que extracto obtenido con disolventes (alcohol etílico, cloroformo y éter de petróleo) tendría mejor efecto así como la dosis más eficaz. Esta prueba se realizó sobre el nivel de triglicéridos.

En primer lugar se evaluó el extracto obtenido utilizando como disolvente el éter de petróleo, se procedió conforme el método descrito (2.6.), se utilizaron tres animales de experimentación por grupo a los que previamente antes de iniciar se tomó los valores basales de su perfil lipídico, posteriormente se sometió a la dieta hipercalórica con alto contenido en lípidos, luego de la cual se determinó el perfil lipídico alcanzado. Posteriormente y luego de administrar los tratamientos

consistentes en una dosis de 500 mg/kg y otra de 1000 mg/kg, durante un mes se volvió a medir el perfil lipídico de los animales de experimentación a fin de observar las diferencias entre los distintos grupos.

En la **Tabla N°2** muestra los resultados para el grupo tratado con extracto de chía que utiliza como disolvente éter de petróleo. En donde se midió el nivel de triglicéridos a los 30 días de administrado el tratamiento. Podemos observar que el promedio de triglicéridos en el estado basal es de 21 mg/dL, en la inducción (luego de administrado la dieta hipercalórica con alto contenido en lípidos) alcanza un nivel de triglicéridos de 33.67 mg/dL. Posterior a la administración del extracto (*Salvia hispánica* L.) a una dosis de 500 mg/kg en nivel de triglicéridos desciende a 31.67 mg/dL y a una dosis de 1000 mg/kg en nivel de triglicéridos desciende a 28 mg/dL.

Tabla N°2

Prueba piloto: Promedios del efecto del extracto de *Salvia hispánica* L. obtenido con éter de petróleo sobre niveles de triglicéridos.

Grupo de tratamiento Piloto	N	Media	Mediana	Desv. típ.
Basal	3	21.00	21.00	1.00
Inducción	3	33.67	34.00	2.52
Éter de petróleo 500mg/kg	3	31.67	32.00	1.53
Éter de petróleo 1000mg/kg	3	28.00	28.00	1.00
Total	12			

FUENTE: Elaboración propia.

Debido a que son cuatro mediciones a comparar, es necesaria una prueba de especificidad que confronte de par en par cada grupo de datos provenientes de las mediciones antes citadas, es por ello que se practica una prueba de especificidad de Tukey cuyos resultados referentes a los subconjuntos homogéneos formados a un nivel de confianza del 95% se muestran en el **Tabla N°3**.

Los resultados en la **Tabla N°3** muestra que el extracto obtenido con éter de petróleo a una dosis de 500 mg/kg forma un subconjunto homogéneo con el estado inducción (hiperlipidémico), con una media de 31.67 mg/dL y 33.67 mg/dL respectivamente. Por otra parte la medición realizada al grupo evaluado con una dosis de 1000 mg/kg forma un subconjunto homogéneo junto al grupo tratado con la dosis de 500 mg/kg (recordemos que este es similar al estado hiperlipidémico), y que a su vez es estadísticamente distinto del grupo basal.

Con estos resultados estadísticos observamos que el extracto de chía obtenido con éter de petróleo disminuye el nivel de triglicéridos y que tiene un mayor efecto a una concentración de 1000 mg/kg, pero no lo hace de una manera significativa en comparación con el estado basal.

Tabla N°3

Prueba Piloto: Test de Tukey para los triglicéridos para el extracto de chía con éter de petróleo

Grupo de tratamiento Piloto	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Basal	3	21.00		
Extracto éter de petróleo 1000mg/kg	3		28.00	
Extracto éter de petróleo 500mg/kg	3		31.67	31.67
Inducción	3			33.67
Sig.		1,000	,095	,480

FUENTE: Elaboración propia.

En la **Tabla N°4** muestra los resultados para el grupo tratado con extracto de chía que utiliza como disolvente cloroformo. Al igual que el grupo anterior y para todas los grupos piloto sólo se midió el nivel de triglicéridos a los 30 días de administrado el tratamiento. Como se observa que el promedio en el estado basal es de 26.33 mg/dL, que en la inducción, alcanza un nivel de triglicéridos de 36.33 mg/dL. Posterior a la administración del extracto a una dosis de 500 mg/kg en

nivel de triglicéridos desciende a 32.67 mg/dL y a la dosis de 1000 mg/kg en nivel de triglicéridos desciende a 29.67 mg/dL.

Figura N°1

Promedios de Triglicéridos para el extracto de chía con éter de petróleo

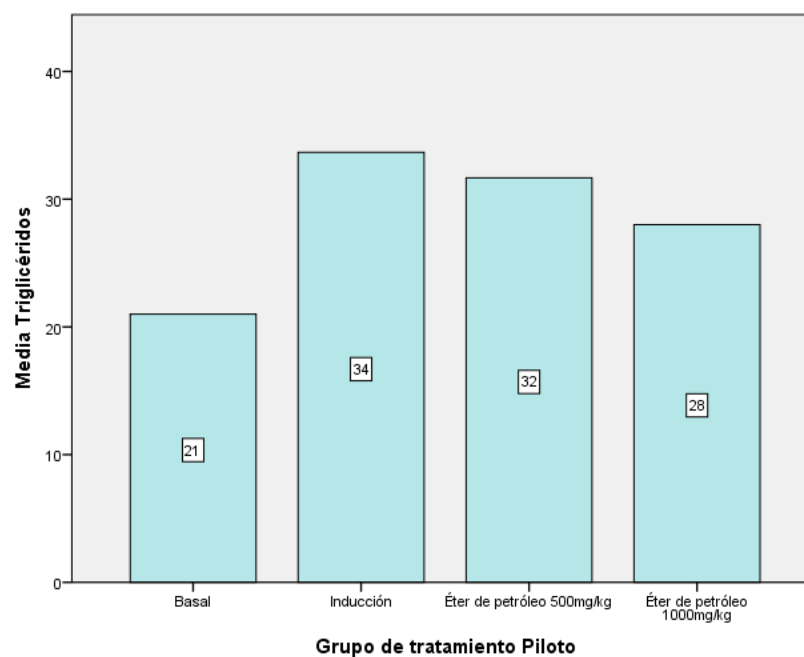


Tabla N°4

Prueba piloto: Promedios del efecto del extracto de *Salvia hispánica* L. obtenido con cloroformo sobre niveles de triglicéridos.

Grupo de tratamiento Piloto	N	Media	Mediana	Desv. típ.
Basal	3	26,33	25,00	2,31
Inducción	3	36,33	37,00	2,08
Extracto cloroformo 500 mg/kg	3	32,67	33,00	2,52
Extracto cloroformo 1000mg/kg	3	29,67	29,00	2,08
Total	12			

FUENTE: Elaboración propia.

En razón a que son cuatro mediciones a comparar, es necesaria una prueba de especificidad que confronte de par en par cada grupo de datos provenientes de las mediciones antes citadas, es por ello que se practica una prueba de especificidad de Tukey cuyos resultados referentes a los subconjuntos homogéneos formados a un nivel de confianza del 95% se muestran en el **Tabla N°5**.

Los resultados de esta **Tabla N°5** nos muestran que el extracto obtenido con cloroformo a una dosis de 500 mg/kg no se diferencia del nivel hiperlipidémico (inducción), ya que junto a este forma un subconjunto homogéneo con una media de 32.67 mg/dL y 36.33 mg/dL respectivamente. Por otra parte la medición realizada al grupo evaluado con una dosis de 1000 mg/kg forma un subconjunto homogéneo junto con la medición basal, pero a su vez forma un subconjunto junto al grupo tratado con la dosis de 500 mg/kg (recordemos que este es similar al estado hiperlipidémico).

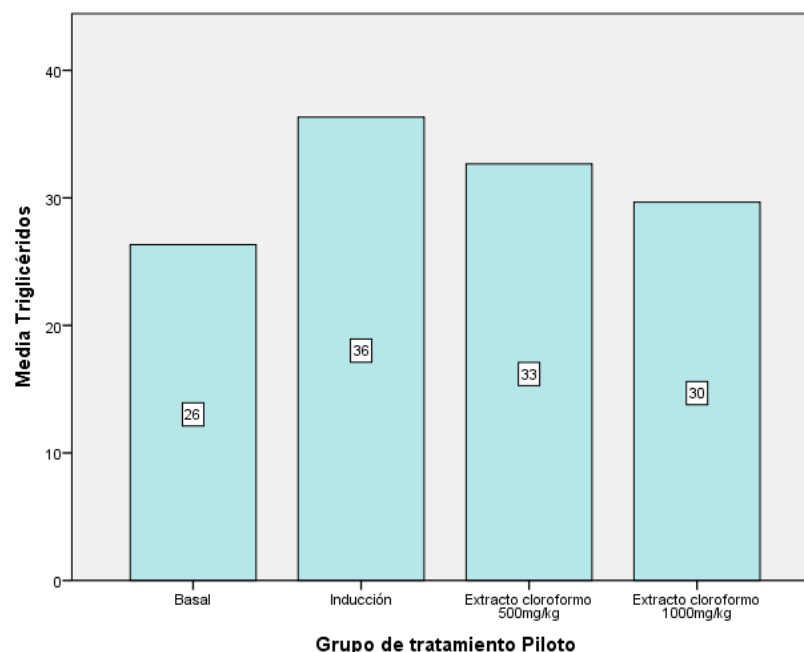
Con estos resultados estadísticos observamos que el extracto de chía obtenido con cloroformo y a una dosis de 1000 mg/kg disminuye el nivel de triglicéridos pero su efecto que no es del todo claro ya que es similar al basal (normal) y al extracto de cloroformo a una dosis de 500 mg/kg.

Tabla N°5

Prueba Piloto: Test de Tukey para los triglicéridos para el extracto de chía con cloroformo

Grupo de tratamiento Piloto	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Basal	3	26,33		
Extracto cloroformo 1000 mg/kg	3	29,67	29,67	
Extracto cloroformo 500 mg/kg	3		32,67	32,67
Inducción	3			36,33
Sig.		,335	,416	,267

FUENTE: Elaboración propia.

Figura N°2
Promedios de triglicéridos para el extracto de chía con Cloroformo


En la **Tabla N°6** muestra los resultados para el grupo tratado con extracto de chía que utiliza como disolvente alcohol etílico. Como se observa el promedio de triglicéridos en el estado basal es de 20.67 mg/dL que en la inducción, alcanza un nivel de triglicéridos de 35.33 mg/dL. Posterior a la administración del extracto a una dosis de 500 mg/kg en nivel de triglicéridos desciende a 29.67 mg/dL y a la dosis de 1000 mg/kg en nivel de triglicéridos desciende a 22.33 mg/dL.

Tabla N°6
Prueba piloto: Promedios del efecto del extracto de *Salvia hispánica* L. obtenido con alcohol etílico sobre niveles de triglicéridos.

Grupo de tratamiento Piloto	N	Media	Mediana	Desv. típ.
Basal	3	20,67	21,00	1,53
Inducción	3	35,33	36,00	2,08
Extracto etanólico 500 mg/kg	3	29,67	30,00	1,53
Extracto etanólico 1000 mg/kg	3	22,33	23,00	3,05
Total	12			

FUENTE: Elaboración propia.

Del mismo modo debido a que son cuatro mediciones a comparar, es necesaria una prueba de especificidad que confronte de par en par cada grupo de datos provenientes de las mediciones antes citadas, es por ello que se practica una prueba de especificidad de Tukey.

Los resultados de este procedimiento se observan en el **Tabla N°7** se muestra que el extracto de chía obtenido con alcohol etílico a una dosis de 500 mg/kg es estadísticamente diferente de los valores con hiperlipidemia (inducción), y a su vez es diferente de la dosis de 1000 mg/kg. El extracto de chía a una dosis de 1000 mg/kg forma un subconjunto homogéneo con el estado basal, y ambos (el basal y la dosis de 1000 mg/kg) son diferentes de resto de valores experimentales.

Por lo tanto podemos concluir en base a nuestros resultados que el extracto de chía utilizando como disolvente alcohol etílico y a una dosis de 1000 mg/kg, presento mejor eficacia en la reducción de los niveles de triglicéridos, ya que su efecto luego de 30 días es similar al estado basal y distinto de la otra dosis y al estado inducción (hiperlipidémico). Por lo que para la prueba final se utilizará el extracto con alcohol etílico.

Tabla N°7

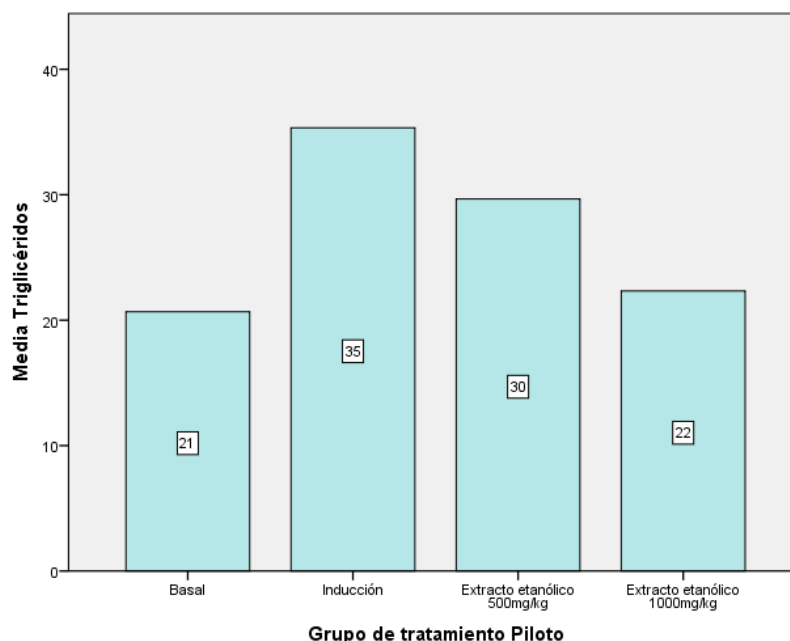
Prueba Piloto: Test de Tukey para los triglicéridos para el extracto de chía con alcohol etílico

Grupo de tratamiento Piloto	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Basal	3	20,67		
Extracto etanólico 1000 mg/kg	3	22,33		
Extracto etanólico 500 mg/kg	3		29,67	
Inducción	3			35,33
Sig.		,778	1,000	1,000

FUENTE: Elaboración propia.

Figura N°3

Promedios de Triglicéridos para el extracto de chía con alcohol etílico



3.3.2.PRUEBA FINAL DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE

Una vez establecido la naturaleza del disolvente para obtener el extracto de *Salvia hispánica* L. (chía) así como la probable dosis experimental, se procedió a la realización de la prueba final.

Para ello se utilizaron 3 grupos de experimentación: grupo de cinco animales para la administración del extracto de chía con una dosis de 1000 mg/kg, otro de cinco animales para el grupo control positivo consistente en la administración de gemfibrozilo como fármaco hipolipemiante, y un grupo control negativo al que no se administró ningún tratamiento. Las mediciones fueron conforme al método (2.7), es decir, una basal, otra tras la administración de la dieta hipercalórica con alto contenido en lípidos, luego una tras 15 días de tratamiento y finalmente una medición del perfil lipídico a los 30 días de administrados los tratamientos.

En la **Tabla N°8** muestra los resultados para el Colesterol total en la prueba final; consistente en tres grupos de experimentación (grupo control, grupo tratado con extracto de chía a una dosis de 1000 mg/kg y un grupo tratado con

gemfibrozilo), conformado cada grupo por 5 animales de experimentación, midiendo el colesterol total a un tiempo 0 (basal), luego de la inducción (hiperlipidemia), a los 15 y 30 días de tratamiento. Se observa que los promedios de los niveles basales de colesterol total se encuentran alrededor de 55 mg/dL y 56 mg/dL. En el estado de hiperlipidemia el grupo gemfibrozilo muestra un promedio de 88.20 mg/dL, seguido del grupo control 86,00 mg/dL y el extracto 85,20 mg/dL. A los 15 días de tratamiento el grupo tratado con gemfibrozilo es el que tiene el menor nivel de colesterol con 71.60 mg/dL seguido de grupo tratado con extracto de chía con 75.20 mg/dL, y finalmente el grupo control 79.00 mg/dL. Algo similar sucede a los 30 días de tratamiento ya que el grupo tratado con gemfibrozilo muestra un nivel de 57 mg/dL, seguido del grupo tratado con extracto de chía con 58.80 mg/dl y finalmente el grupo control 72.40 mg/dL de colesterol total. Estos resultados pueden hacernos concluir que el grupo tratado con extracto de chía disminuye los niveles de colesterol total similar al grupo tratado con gemfibrozilo, sin embargo, es imprescindible una prueba de hipótesis que nos confirme o descarte esta sospecha, dicha prueba es el test de Tukey que se detalla a continuación.

Tabla N°8

Prueba final: Promedios del efecto del extracto etanólico de *Salvia hispánica* L. sobre niveles de colesterol total en animales de experimentación.

Medición	Grupo de tratamiento	N	Media	Mediana	Desv. típ.
Basal (tiempo 0)	Control	5	56,40	55,00	4,98
	Extracto 1000 mg/kg	5	55,80	54,00	6,05
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	55,80	55,00	3,96
Hiperlipidemia	Control	5	86,00	85,00	5,95
	Extracto 1000 mg/kg	5	85,20	88,00	5,35
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	88,20	88,00	2,86
15 días tratamiento	Control	5	79,00	79,00	4,30
	Extracto 1000 mg/kg	5	75,20	75,00	4,65
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	71,60	72,00	5,72
30 días tratamiento	Control	5	72,40	72,00	5,32
	Extracto 1000 mg/kg	5	58,80	61,00	6,61
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	57,00	58,00	3,53

FUENTE: Elaboración propia.

En la **Tabla N°9** muestra un resumen (basado en el procedimiento de Tukey) del resultado obtenido de comparaciones múltiples aplicado al análisis factorial anterior. En este resumen, los grupos cuyas medias no difieren entre si están agrupados en el mismo subconjunto y los grupos cuyas medias difieren forman parte de subconjuntos diferentes. En este sentido, en nuestros resultados, vemos que existe un primer subconjunto formado por el grupo tratado con gemfibrozilo y el extracto etanólico de chía a una dosis de 1000 mg/kg; y un segundo subconjunto formado por el grupo control. Podemos concluir que el extracto de chía administrado a una dosis de 1000 mg/kg tendría un efecto sobre la disminución del nivel de colesterol total estadísticamente similar al gemfibrozilo y diferente al grupo control.

Tabla N°9

Prueba Final: Test de Tukey para el colesterol total de los animales de experimentación en los distintos grupos experimentales

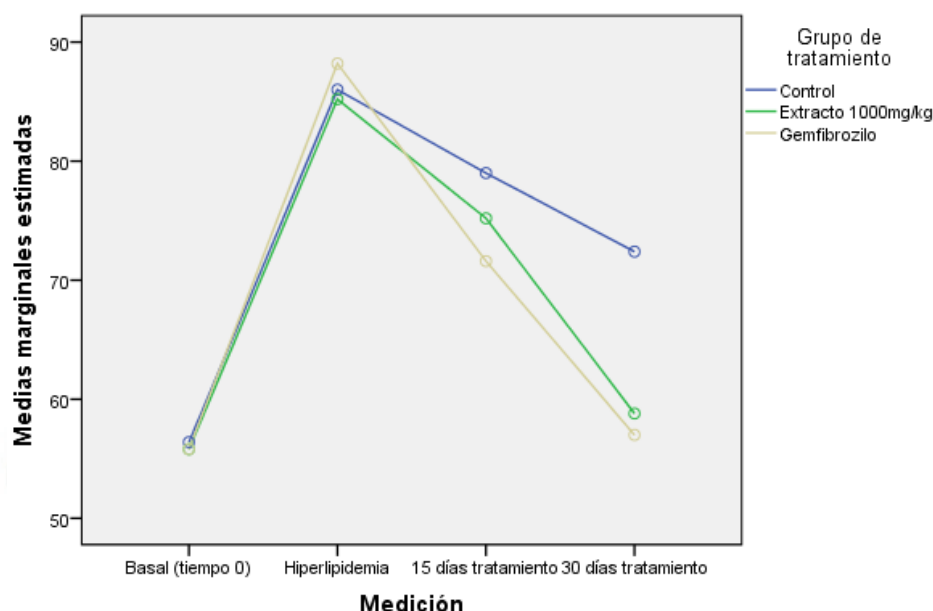
Grupo de tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	20	68,15	
Extracto 1000 mg/kg	20	68,75	
Control	20		73,45
Sig.		,926	1,000

FUENTE: Elaboración propia.

La **figura N°4** ilustra mejor estos resultados, este gráfico considera los promedios de los grupos de tratamiento en los distintos tiempos de medición.

Figura N°4

Promedios de colesterol total en la prueba final para los distintos grupos de tratamiento experimentales



En la **Tabla N°10** muestra los resultados para triglicéridos en la prueba final; consistente en tres grupos de experimentación (control, grupo tratado con extracto de chía a una dosis de 1000 mg/kg y un grupo tratado con gemfibrozilo), conformado cada grupo por 5 animales de experimentación, midiendo los triglicéridos a un tiempo 0 (basal), luego de la inducción (hiperlipidemia), a los 15 y 30 días de tratamiento. Se observa que los promedios de los niveles basales son un tanto variables ya que para el grupo control es de 20.40 mg/dL, grupo extracto es de chía 18.20 mg/dL, y para el grupo gemfibrozilo es de 24.20 mg/dL. Sin embargo en el estado de hiperlipidemia todos los grupos alcanzan un nivel similar de triglicéridos, con un nivel que esta alrededor de 33 mg/dL. A los 15 días de tratamiento el grupo tratado con gemfibrozilo es el que tiene el menor nivel de triglicéridos con 27.20 mg/dL seguido de grupo tratado con extracto de chía con 28.00 mg/dL, y finalmente el grupo control 36.80mg/dL. A los 30 días de tratamiento el grupo tratado con gemfibrozilo muestra un nivel de 24.80 mg/dL, seguido del grupo tratado con extracto de chía con 24.20 mg/dL y finalmente el grupo control 29.00 mg/dL. Estos resultados pueden hacernos concluir al grupo tratado con extracto de chía disminuye el nivel de Triglicéridos al igual que el grupo tratado con

gemfibrozilo, sin embargo, es imprescindible una prueba de hipótesis que nos confirme o descarte esta sospecha, dicha prueba es el test de Tukey que se detalla a continuación.

En la **Tabla N°11** muestra un resumen (basado en el procedimiento de Tukey) del resultado obtenido de comparaciones múltiples aplicado al análisis factorial anterior. Del mismo modo en este resumen, los grupos cuyas medias no difieren entre sí están agrupados en el mismo subconjunto y los grupos cuyas medias difieren forman parte de subconjuntos diferentes. En este orden de ideas, en nuestros resultados, vemos que existe un primer subconjunto formado por el grupo tratado con gemfibrozilo y el extracto etanólico de chía a una dosis de 1000 mg/kg; y un segundo subconjunto formado por el grupo control. Podemos concluir que el extracto de chía administrado a una dosis de 1000 mg/kg tendría un efecto sobre la disminución del nivel de triglicéridos estadísticamente similar al gemfibrozilo y diferente al grupo control.

Tabla N°10

Prueba final: Promedios del efecto del extracto etanólico de *Salvia hispánica* L. sobre niveles de Triglicéridos en animales de experimentación.

Medición	Grupo de tratamiento	N	Media	Mediana	Desv. típ.
Basal (tiempo 0)	Control	5	20,40	21,00	1,82
	Extracto 1000 mg/kg	5	18,20	18,00	1,92
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	24,20	24,00	0,83
Hiperlipidemia	Control	5	33,00	33,00	2,55
	Extracto 1000 mg/kg	5	33,60	32,00	2,88
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	33,20	34,00	2,28
15 días tratamiento	Control	5	36,80	37,00	1,92
	Extracto 1000 mg/kg	5	28,00	28,00	1,58
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	27,20	27,00	0,83
30 días tratamiento	Control	5	29,00	29,00	1,58
	Extracto 1000 mg/kg	5	24,20	24,00	2,28
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	24,80	24,00	1,92

FUENTE: Elaboración propia.

Tabla N°11

Prueba Final: Test de Tukey para los Triglicéridos de los animales de experimentación en los distintos grupos experimentales

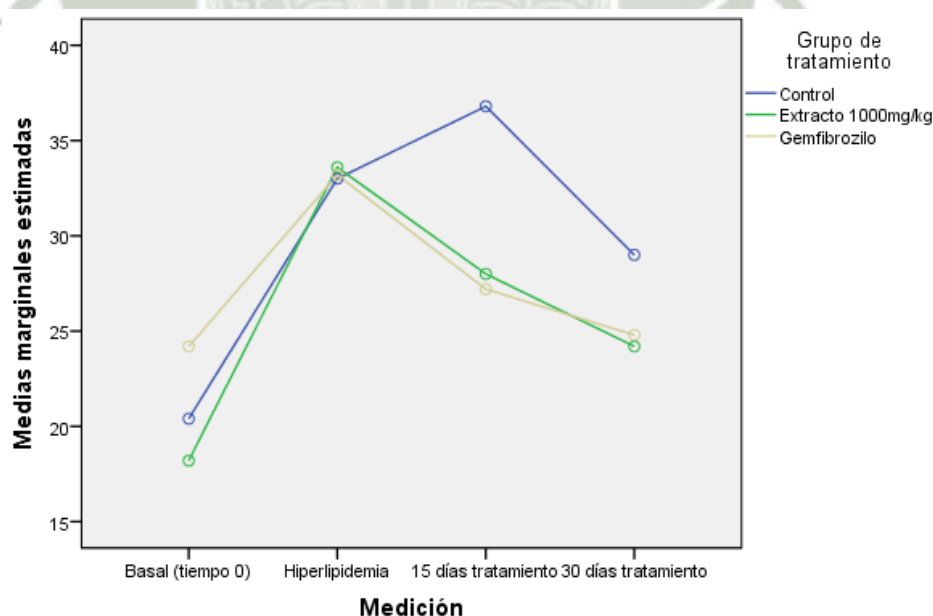
Grupo de tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
Extracto 1000mg/kg	20	26,00	
Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	20	27,35	
Control	20		29,80
Sig.		,085	1,000

FUENTE: Elaboración propia.

La **figura N°5** ilustra mejor estos resultados, este gráfico considera los promedios de los grupos de tratamiento en los distintos tiempos de medición.

Figura N°5

Promedios de Triglicéridos en la prueba final para los distintos grupos de tratamiento experimentales



En la **Tabla N°12** muestra los resultados para el HDL-colesterol en la prueba final; consistente en tres grupos de experimentación (control, grupo tratado con extracto de chía a una dosis de 1000 mg/kg y un grupo tratado con gemfibrozilo), conformado cada grupo por 5 animales de experimentación, midiendo el nivel de HDL a un tiempo 0 (basal), luego de la inducción (hiperlipidemia), a los 15 y 30 días de tratamiento. Se observa que los promedios de los niveles basales se ubican alrededor de 10 y 11 mg/dL. En la hiperlipidemia también existe un rango corto ya que los valores están entre 16 y 17 mg/dL para los tres grupos. A los 15 días de tratamiento existe similitud entre el grupo control y el grupo tratado con gemfibrozilo. A los 30 días de tratamiento el grupo tratado con gemfibrozilo muestra un nivel de 12.20 mg/dL que es el mayor, en cambio el grupo tratado con extracto y el grupo control tienen valores similares (10.62 y 10.26 mg/dL respectivamente), es imprescindible también una prueba de hipótesis que nos confirme o descarte esta sospecha, dicha prueba es el test de Tukey que se detalla a continuación.

Tabla N°12

Prueba final: Promedios del efecto del extracto etanólico de *Salvia hispánica* L. sobre niveles de HDL-Colesterol en animales de experimentación.

Medición	Grupo de tratamiento	N	Media	Mediana	Desv. típ.
Basal (tiempo 0)	Control	5	11.78	11.60	0.75
	Extracto 1000 mg/kg	5	10.76	11.00	1.11
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	11.54	11.40	0.79
Hiperlipidemia	Control	5	16.44	16.60	1.75
	Extracto 1000 mg/kg	5	17.94	18.30	1.71
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	17.12	17.90	1.50
15 días tratamiento	Control	5	14.30	14.30	0.95
	Extracto 1000 mg/kg	5	15.36	15.30	1.62
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	14.44	14.10	1.21
30 días tratamiento	Control	5	10.62	10.80	0.64
	Extracto 1000 mg/kg	5	10.26	10.00	1.21
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	12.20	12.10	1.18

FUENTE: Elaboración propia.

En la **Tabla N°13** muestra un resumen (basado en el procedimiento de Tukey) del resultado obtenido de comparaciones múltiples aplicado al análisis factorial anterior. Del mismo modo en este resumen, los grupos cuyas medias no difieren entre si están agrupados en el mismo subconjunto y los grupos cuyas medias difieren forman parte de subconjuntos diferentes. En nuestros resultados, vemos que existe solo un grupo homogéneo conformado por los tres grupos experimentales. Podemos concluir que el extracto etanólico de chía administrado a una dosis de 1000 mg/kg no tendría un efecto sobre el nivel de HDL-colesterol ya que es estadísticamente similar al gemfibrozilo y estos al grupo control.

Tabla N°13

Prueba Final: Test de Tukey para HDL Colesterol de los animales de experimentación en los distintos grupos experimentales

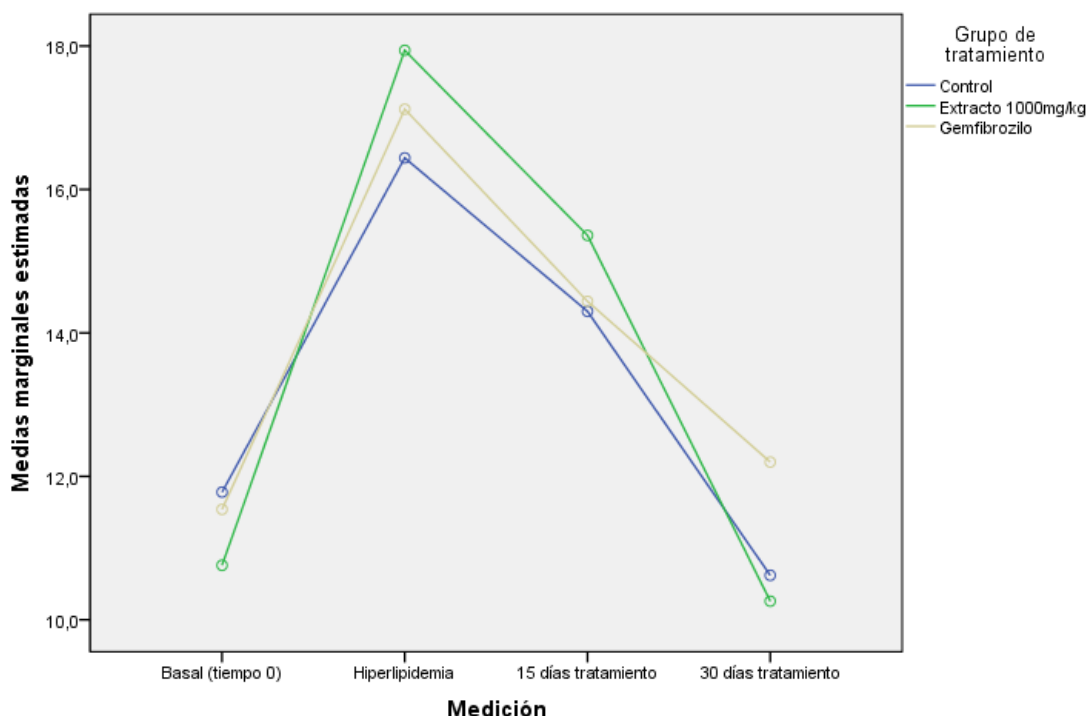
Grupo de tratamiento	N	Subconjunto
		1
Control	20	13.285
Extracto 1000 mg/kg	20	13.580
Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	20	13.825
Sig.		,372

FUENTE: Elaboración propia.

La **figura N°6** ilustra mejor estos resultados, este gráfico considera los promedios de los grupos de tratamiento en los distintos tiempos de medición.

Figura N°6

Promedios de HDL Colesterol en la prueba final para los distintos grupos de tratamiento experimentales



En la **Tabla N°14** muestra los resultados para LDL-Colesterol en la prueba final; consistente en tres grupos de experimentación (control, grupo tratado con extracto de chía a una dosis de 1000 mg/kg y un grupo tratado con gemfibrozilo), conformado cada uno por 5 animales de experimentación, midiendo el nivel de LDL colesterol a un tiempo 0 (basal), luego de la inducción (hiperlipidemia), a los 15 y 30 días de tratamiento. Se observa que los promedios de los niveles basales son un tanto diversos, así el grupo control muestra un nivel de LDL colesterol de 36.48 mg/dL, seguido del grupo extracto con 31.6 mg/dL y el grupo gemfibrozilo con 34 mg/dL. En la hiperlipidemia existe una diferencia de 5 puntos del grupo extracto y el grupo gemfibrozilo. A los 15 días de tratamiento los grupos cuyos tratamientos con extracto y gemfibrozilo son similares y un tanto alejados del control. A los 30 días de tratamiento el grupo tratado con gemfibrozilo muestra un nivel de LDL-colesterol de 38.20 mg/dL que es el mayor, en cambio el grupo tratado con extracto tiene un nivel de LDL-colesterol de 34.8 mg/dL y el grupo

control 37.7 mg/dL, por lo que es imprescindible hacer una prueba de hipótesis que nos confirme o descarte esta sospecha, dicha prueba es el test de Tukey que se detalla a continuación.

Tabla N°14

Prueba final: Promedios del efecto del extracto etanólico de *Salvia hispánica* L. sobre niveles de LDL-Colesterol en animales de experimentación.

Medición	Grupo de tratamiento	N	Media	Mediana	Desv. típ.
Basal (tiempo 0)	Control	5	36.48	37.20	1.94
	Extracto 1000 mg/kg	5	31.60	33.00	4.10
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	34.00	33.60	2.24
Hiperlipidemia	Control	5	52.86	51.00	8.60
	Extracto 1000 mg/kg	5	55.20	55.40	1.90
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	50.50	49.50	4.74
15 días tratamiento	Control	5	50.18	50.30	1.46
	Extracto 1000 mg/kg	5	46.12	45.60	3.02
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	48.12	48.00	1.14
30 días tratamiento	Control	5	37.76	36.60	2.83
	Extracto 1000 mg/kg	5	34.80	33.90	4.70
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	38.32	38.10	1.72

FUENTE: Elaboración propia.

En la **Tabla N°15** muestra un resumen (basado en el procedimiento de Tukey) del resultado obtenido de comparaciones múltiples aplicado al análisis factorial anterior. En esta tabla los grupos cuyas medias no difieren entre si están agrupados en el mismo subconjunto y los grupos cuyas medias difieren forman parte de subconjuntos diferentes. En nuestros resultados, vemos que existe solo un grupo homogéneo conformado por los tres grupos experimentales. Podemos concluir que el extracto etanólico de chía administrado a una dosis de 1000 mg/kg no tendría un efecto sobre el nivel de LDL-colesterol ya que es estadísticamente similar al gemfibrozilo y estos al grupo control.

Tabla N°15

**Prueba Final: Test de Tukey para LDL Colesterol de los animales de
experimentación en los distintos grupos experimentales**

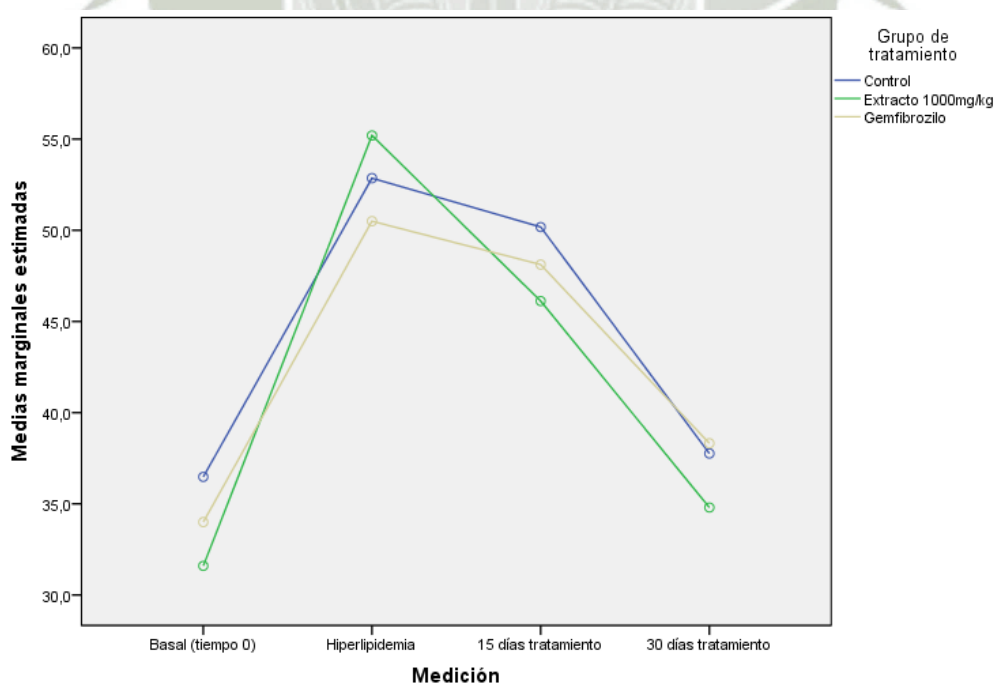
Grupo de tratamiento	N	Subconjunto
		1
Extracto 1000 mg/kg	20	41.930
Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	20	42.735
Control	20	44.320
Sig.		,124

FUENTE: Elaboración propia.

La **figura N°7** ilustra mejor estos resultados, este gráfico considera los promedios de los grupos de tratamiento en los distintos tiempos de medición.

Figura N°7

**Promedios de LDL colesterol en la prueba final para los distintos grupos de
tratamiento experimentales**



En la **Tabla N°16** muestra los resultados para el peso corporal de los animales de experimentación en la prueba final; consistente en tres grupos de experimentación (control, grupo tratado con extracto de chíá a una dosis de 1000 mg/kg y un grupo tratado con gemfibrozilo), conformado cada uno por 5 animales de experimentación, midiendo el peso corporal a un tiempo 0 (basal), luego de la inducción (hiperlipidemia), a los 15 y 30 días de tratamiento. Se observa que los promedios de los pesos corporales en todos los tiempos son similares. Nótese un incremento de alrededor de 10g entre el peso basal y el de hiperlipidemia. El descenso del peso corporal es paulatino a los 15 días y 30 días de tratamiento.

Tabla N°16

Prueba final: Promedios del efecto del extracto etanólico de *Salvia hispánica* L. sobre peso corporal en animales de experimentación.

Medición	Grupo de tratamiento	N	Media	Mediana	Desv. típ.
Basal (tiempo 0)	Control	5	251,00	248,00	14,52
	Extracto 1000mg/kg	5	250,80	251,00	3,03
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	251,60	253,00	7,23
Hiperlipidemia	Control	5	263,60	265,00	12,42
	Extracto 1000mg/kg	5	261,60	260,00	4,82
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	263,60	265,00	5,36
15 días tratamiento	Control	5	263,00	260,00	8,45
	Extracto 1000mg/kg	5	259,60	259,00	5,81
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	258,00	258,00	2,12
30 días tratamiento	Control	5	254,80	252,00	11,94
	Extracto 1000mg/kg	5	252,40	249,00	9,39
	Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	5	251,40	251,00	2,61

FUENTE: Elaboración propia.

El **Tabla N°17** muestra un resumen (basado en el procedimiento de Tukey) del resultado obtenido de comparaciones múltiples aplicado al análisis factorial anterior. En esta tabla los grupos cuyas medias no difieren entre si están agrupados en el mismo subconjunto y los grupos cuyas medias difieren forman parte de subconjuntos diferentes. En nuestros resultados, vemos que existe solo un grupo homogéneo conformado por los tres grupos experimentales. Podemos concluir que el extracto etanólico de chía administrado a una dosis de 1000 mg/kg no tendría un efecto sobre el peso corporal de los animales de experimentación ya que es estadísticamente similar al gemfibrozilo y estos al grupo control.

Tabla N°17

Prueba Final: Test de Tukey para Peso corporal de los animales de experimentación en los distintos grupos experimentales

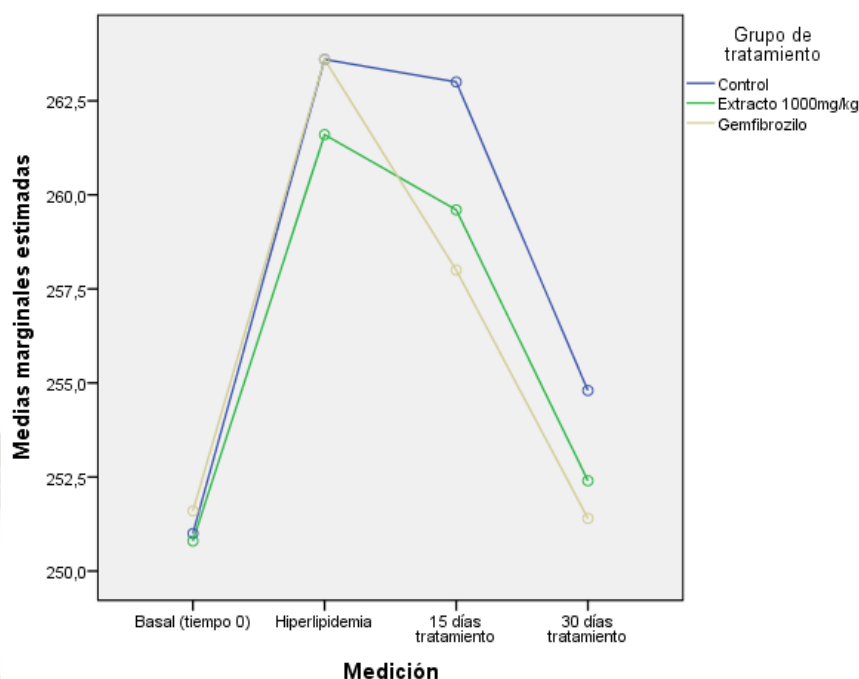
Grupo de tratamiento	N	Subconjunto
		1
Extracto 1000 mg/kg	20	256,10
Gemfibrozilo 4.5 mg/kg	20	256,15
Control	20	258,10
Sig.		,728

FUENTE: Elaboración propia.

La **figura N°8** ilustra mejor estos resultados, este gráfico considera los promedios de los grupos de tratamiento en los distintos tiempos de medición.

Figura N°8

Promedios los pesos corporales en la prueba final para los distintos grupos de tratamiento experimentales



3.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

3.4.1.Preparación de la curva de calibración

En primer lugar se preparó la curva de calibración Trolox conforme al método descrito en el capítulo anterior (2.8.1.2), los resultados en la **Tabla N°18**.

En la **figura N°7** se observa el grafico resultante de los datos mencionados en la tabla N°18. En donde se obtuvo un valor de $R^2 = 0.9962$, valor muy cercano a la unidad, por lo tanto la ecuación obtenida es adecuada para servir de referencia al realizar los cálculos respectivos para determinar la capacidad antioxidante de las muestras.

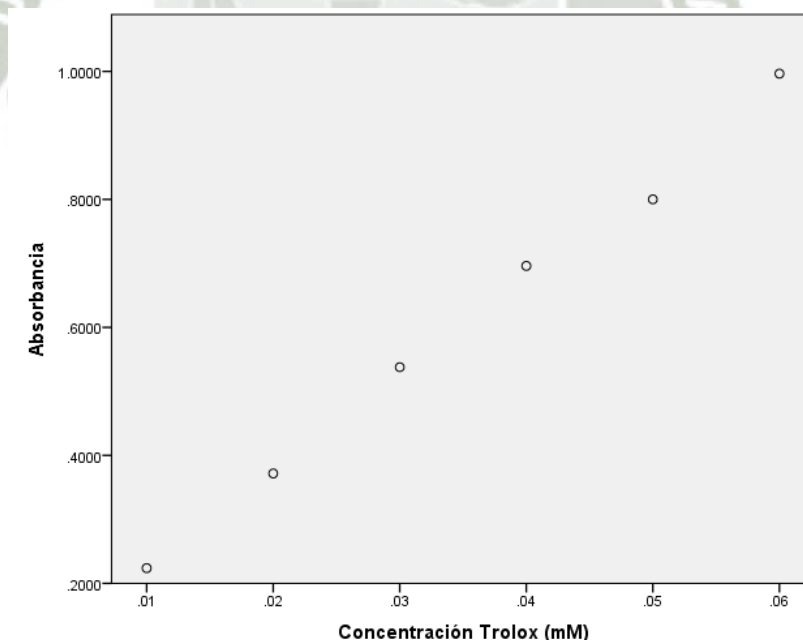
Tabla N°18: Preparación de la curva de calibración, utilizando como estándar soluciones de Trolox a diferentes concentraciones

Concentración Solución Trolox	Absorbancia
0.01 mM	0.2238
0.02 mM	0.3717
0.03 mM	0.5378
0.04 mM	0.6961
0.05 mM	0.8000
0.06 Mm	0.9965

FUENTE: Elaboración propia.

Figura N°7

Curva de calibración, utilizando como estándar soluciones de Trolox a diferentes concentraciones



FUENTE: Elaboración propia.

Ecuación:

$$y = 15.162x + 0.0736$$

$$r^2 = 0.9962 \quad \text{Ec. 3.1}$$

Dónde:

 Y = Absorbancia

 X = Concentración

 a = Intercepto

 b = Pendiente

Mediante el programa estadístico también se determinó el coeficiente de correlación. En la **Tabla N° 19**, como en nuestra curva solo hay solo seis lecturas de absorbancias (variable dependiente) y seis concentraciones Trolox (variable independiente), los dos valores de R^2 (el corregido y el no corregido) son prácticamente iguales.

Tabla N°19: Coeficiente de correlación para la curva de calibración Trolox

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,998 ^a	,996	,995	.0196907

FUENTE: Elaboración propia.

Posteriormente al realizar un Anova, para estas lecturas y determinar si existe relación significativa entre estas variables, observamos que en la **Tabla N° 20** se obtiene el estadístico F cuya Sig. Asociada es de 0.000, lo que nos permite concluir que estas variables están linealmente relacionadas.

Tabla N°20: Anova para la de correlación de la curva de calibración Trolox

	Modelo	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	,402	1	,402	1037,593	,000 ^b
	Residual	,002	4	,000		
	Total	,404	5			

FUENTE: Elaboración propia.

Luego de esta determinación se preparó una disolución del extracto etanólico de chía (*Salvia hispánica* L.) de modo que su lectura se ubique dentro de la curva de calibración Trolox, una vez logrado ello, que fue a una concentración de 1.031%, se añadieron las alícuotas de la muestra hallándose la siguiente Tabla de concentraciones y absorbancias (Tabla 21).

Tabla N°21: Absorbancias y sus concentraciones para el extracto de chía

Concentración muestra (mM)	Absorbancia muestra
0.0150	0.3080
0.0240	0.4450
0.0390	0.6210
0.0490	0.7700
0.0620	0.8970
0.0790	1.0900

FUENTE: Elaboración propia

Del mismo modo se realizó el análisis de regresión y el Anova cuyos resultados se muestran en los siguientes Tablas N° 22 y N°23.

Tabla N°22: Coeficiente de correlación para el extracto de chía

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,998 ^a	,996	,995	.0196413

FUENTE: Elaboración propia

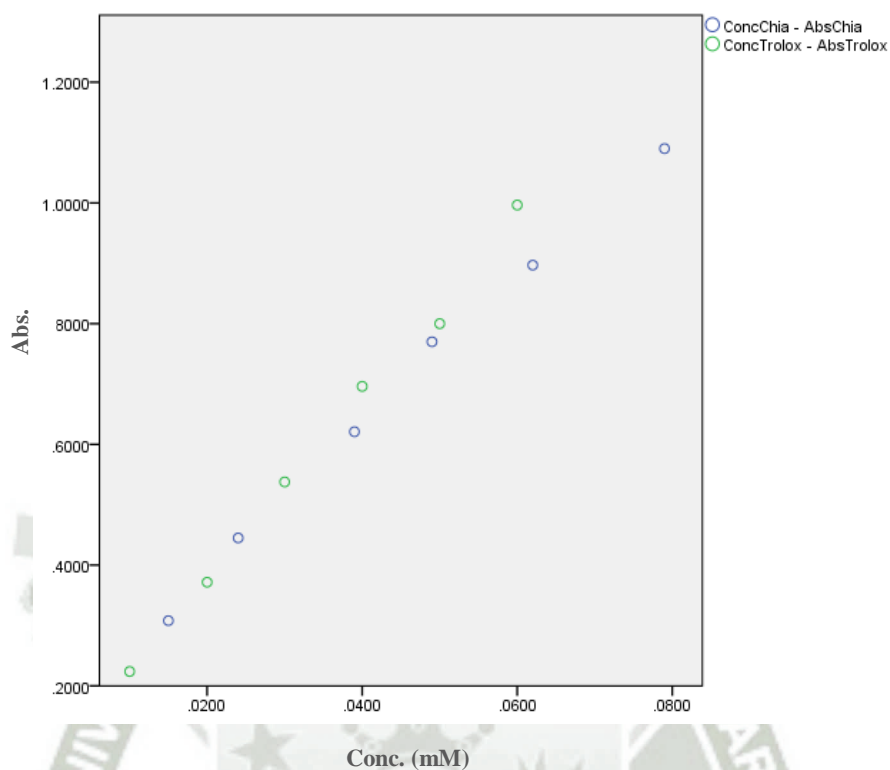
Como se observa el comportamiento lineal del extracto de chía es muy similar a la curva patrón de Trolox. Del mismo modo el análisis de varianza muestra que existe una fuerte relación entre las absorbancias (dependiente) y las concentraciones (independiente) del extracto de chía.

Tabla N°23: Anova para la de correlación del extracto de chía

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	,418	1	,418	1084,563	,000 ^b
Residual	,002	4	,000		
Total	,420	5			

FUENTE: Elaboración propia.

**FIGURA N°8 SUPERPOSICIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN ENTRE
EXTRACTO DE CHÍA Y ESTANDAR “TROLOX”**



3.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante

Ecuación:

$$y = 15.162x + 0.0736$$

$$r^2 = 0.9962$$

$$\text{Capacidad Antioxidante} = \frac{C \times Fd \times V}{P} \quad \text{Ec. 3.2}$$

Donde:

C = Concentración de la muestra obtenida con la ecuación anterior

Fd = Factor de dilución

P = Peso de la muestra

V = Volumen

Después de utilizar la metodología mencionada en 2.8, para medir la capacidad antioxidante del extracto, se realizaron los cálculos pertinentes con la ecuación 3.1 obtenida del gráfico de calibración de Trolox y la ecuación 3.2 para expresar la capacidad antioxidante encontrándose que el extracto etanólico de chía tiene una capacidad antioxidante de 0.69 mmol Trolox/g de muestra.



CONCLUSIONES

PRIMERA

Se realizó la extracción de las semillas de chía (*Salvia hispánica* L.) mediante el método de extracción continua con equipo Soxhlet, utilizando tres disolventes diferentes, éter de petróleo, cloroformo y alcohol etílico, obteniéndose tres extractos cuyos rendimientos fueron del 30% para éter de petróleo, 28.30% para cloroformo y de 18.92% para el alcohol etílico.

SEGUNDA

Mediante la prueba piloto se determinó que el disolvente con mejor actividad sobre el perfil lipídico elevado (hipertrigliceridemia) fue el del alcohol etílico ya que se encontraron diferencias significativas respecto al estado de inducción, y similitud respecto al estado basal a un nivel de confianza del 95%. También permitió determinar la probable dosis inicial en los animales de experimentación y fue la de 1000 mg/kg/día para el extracto de semillas de *Salvia hispánica* L “chía”.

TERCERA

Se realizó la determinación de la composición fitoquímica preliminar de las semillas de chía (*Salvia hispánica* L.) mediante el método de cromatografía en capa fina, detectándose la presencia de terpenos, flavonoides, saponinas y taninos.

CUARTA

El extracto etanólico de “chía” a una dosis de 1000 mg/kg/día posee efecto hipolipemiente ya que produjo una disminución de los niveles Colesterol Total y Triglicéridos estadísticamente similar con el gemfibrozilo “control positivo” en los distintos tiempos observados (15 y 30 días de tratamiento), no observándose lo

mismo con relación a los niveles LDL colesterol y el peso corporal a un nivel de confianza del 95%.

QUINTA

Se determinó la capacidad antioxidante del extracto de las semillas de chía (*Salvia hispánica* L.) mediante el método CUPRAC, utilizando como estándar Trolox, observándose que el extracto tiene una capacidad antioxidante de 0.69 mmol Trolox/g de muestra.



SUGERENCIAS

1. Se sugiere realizar un estudio experimental a fin de determinar la seguridad en la administración oral de las semillas de chía (*Salvia hispánica* L.) así como de su extracto obtenido con alcohol etílico.
2. Realizar un estudio comparativo para determinar la calidad de las semillas de chía (*Salvia hispánica* L.) disponibles en el comercio local de productos naturales.
3. Realizar un estudio a fin de detectar el costo beneficio (respecto a otros tratamientos naturales y convencionales) y los problemas relacionados a la consumo continuo de semillas de chía (*Salvia hispánica* L.).
4. Realizar un estudio *in vivo* para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de las semillas chía (*Salvia hispánica* L.) obtenido mediante extracción con equipo soxhlet.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aldave Pajares Augusto; Mostacero León José: BOTÁNICA FARMACÉUTICA. 1ª Edición. 1988. Editorial Libertad. Lima, Perú.
2. Alvarado Alva J.: APUNTES DE FARMACOLOGÍA. 3ª Edición, 2008. Editorial Apuntes Médicos del Perú, Lima-Perú.
3. Alvarado Rupflin, D.: “CARACTERIZACION DE LA SEMILLA DEL CHAN (Salvia Hispánica L.) Y DISEÑO DE UN PRODUCTO FUNCIONAL QUE LA CONTIENE COMO INGREDIENTE”, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle de Guatemala (2011).
4. Avello M., Suwalsky M.: “RADICALES LIBRES, ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSA ANTIOXIDANTE CELULAR”. Universidad Concepción, 2006.
5. Apak R., et al, Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay, Molecules 12, 1496-1547, 2007.
6. Bernal Osorio, M. “QUÍMICA DE LOS LÍPIDOS”. 1998.
7. Bonal de Falgás (Editor): FARMACIA CLÍNICA, 1ª Edición. 1999. Editorial SINTESIS S.A.
8. Bowman W.C. y Rand M.J.: FARMACOLOGÍA BASES BIOQUÍMICAS Y PATOLÓGICAS APLICACIONES CLÍNICAS, 2ª Edición. 1984. Nueva Editorial Interamericana, México D.F.
9. Bruneton J.: FARMACOGNOSIA FITOQUÍMICA PLANTAS MEDICINALES. 2ª Edición. 2001. Editorial Acribia S.A.
10. Calvo, M.C.; “BIOQUIMICA Y FISIOPATOLOGIA FE LA NUTRICION” Editorias IDE, 1ª Ed. 2005. Dislipidemias y Aterosclerosis en cascales A.M, Espinos P.B. España.
11. Carrasco Díaz S.; METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, 1ª Edición. 2005. Editorial San Marcos. Lima, Perú.

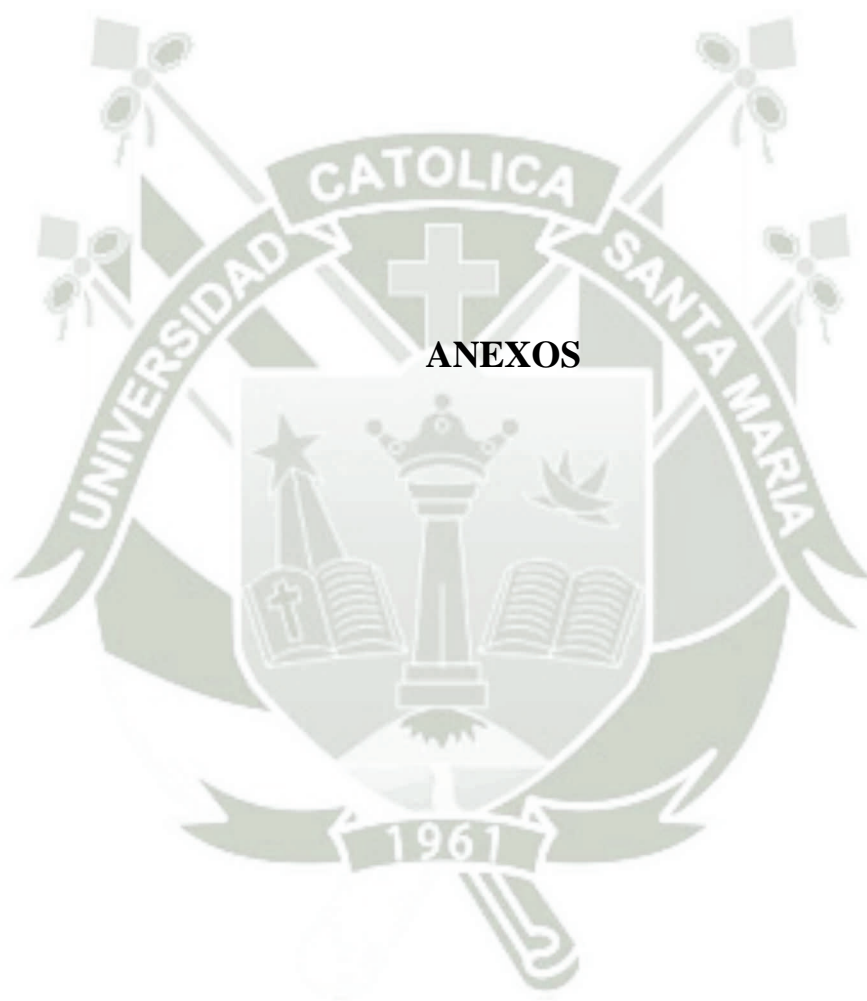
12. Carruthers G. & Hoffman B. & Melmon K. & Nierenberg D.: CLINICAL PHARMACOLOGY. 4ª Edition, 2000. Editorial McGraw Hill.
13. Cervera, Clapes y Rigolfls.; “ALIMENTACIÓN Y DIETO TERAPIA”. 4º Edición. Salud y Dietas.
14. Daniel Wayne: BIOESTADÍSTICA, BASE PARA EL ANÁLISIS DE LAS CIENCIAS DE LA SALUD. 4ª Edición, 2007. Editorial Limusa S.A. México.
15. Flórez Jesús: FARMACOLOGÍA HUMANA, 5ª Edición. 2008. Editorial Elsevier España.
16. Ganong William: FISIOLOGÍA MÉDICA. 19ª Edición, 2009. Editorial El Manual Moderno. México.
17. Garcia-Gutierrez, G., Garduño-Siciliano, L., Beltrán-Osorio, M.: “EVALUACION DEL EFECTO HIPOLIPEMIANTE DE LOS EXTRACTOS DE LA SEMILLA DE CHÍA (Salvia hispánica L.) EN RATONES CON DIETA NORMOLIPIDÉMICA E HIPERCOLESTEROLÉMICA”. Departamento de graduados e Investigación en alimentos, Departamento de Farmacia (IPN). D.F. México – 2012.
18. GOODMAN GILMAN, A. “Las bases farmacológicas en la terapéutica”. Décima Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. México. 2002.
19. Gonzales Ramos, V. “EFECTO HIPOTENSOR E INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE Salvia hispánica L. IN VITRO E IN VIVO”, Monterrey, Nuevo Leon, diciembre de 2011.
20. Gonzales-Torres, M.et al., DAÑO OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES, *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe y Portugal*, Bioquímica vol. 25 N°98, 2000.
21. Guiotto E.: APLICACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE CHÍA (*Salvia Hispánica* L.) Y GIRASOL (*Helianthusannuus* L.) en alimentos, ARGENTINA – 2014. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina.
22. GUYTON, A.C. Y Hall, J.E. “TRATADO DE FISIOLOGÍA MÉDICA”. Décima Edición. México. 2001.

23. HARRISON: “principios de la medicina interna” Sec 2 XIV Edición, Vol. I Editorial Interamericana.
24. HARPER “Bioquímica Ilustrada” 28^{va} edición: Robert K. Murray, David A Bender, Katheleen M. Botham, Peter J Kennelly, Victor W Rodwell, P Anthony Weil. Bioenergética y el metabolismo de carbohidratos y lípidos Sección 2.
25. Hernández Sampieri R., Fernández Collado C.: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN, 5ª Edición, 2010. MCGRAW HILL Interamericana Editores.
26. HERZZENTRUM DORTMUND: Geosalud cardiólogo Emilio Luengo Dislipidemias de la Sociedad Española de Cardiología. 2010.
27. James A. Duke: HANDBOOK OF MEDICINAL PLANTS OF LATIN AMERICA. 1ª Edición. CRC Press. 2007.
28. Karadag A., et al.: REVIEW OF METHODS TO DETERMINE ANTIOXIDANT CAPACITIES, 50-52, Food Anal, Methods. 2009.
29. Kuklinski, Claudia. “FARMACOGNOSIA: ESTUDIO DE LAS DROGAS Y SUSTANCIAS MEDICAMENTOSAS DE ORIGEN NATURAL” 1era Edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona. España.2000.
30. Lamarque Alicia (Coord.): FUNDAMENTOS TEÓRICO PRÁCTICOS DE QUÍMICA ORGÁNICA. 1ª Edición. Editorial Brujas. 2008.
31. Lima L.: “ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES”, Universidad de la Habana, Cuba, 2008.
32. Lock de Ugaz O.: INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA MÉTODOS EN EL ESTUDIO DE PRODUCTOS NATURALES. 1ª Edición. 1998. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú.
33. López A., Moreno L., Villagrasa V.: MANUAL DE FARMACOLOGÍA, GUÍA PARA EL USO RACIONAL DEL MEDICAMENTO. 1ª Edición 2006. Editorial ELSEVIER S.A.
34. López Valencia, Jenny. “PERFIL LIPÍDICO”. Guía de prácticas de análisis clínicos. 2011.

35. Lorenzo P., Moreno A., Leza J.C. y Moro M.A.: VELÁZQUEZ FARMACOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA, 18ª Edición. 2009. Editorial Médica Panamericana.
36. Marcano Deanna y Hasegawa Masahisa: FITOQUÍMICA ORGÁNICA. 2ª Edición. 2002. Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
37. Martínez M.: “TOXICIDAD DE XENOBIOTICOS MEDIADA POR RADICALES LIBRES DE OXIGENO”. ArsPharmaceutica, 39:1 (5-18), 1998.
38. MERCK: “De información médica general Segunda Edición” Merck Sharp & Dohme. MMVIII EDITORIAL OCEANO. Trastornos Nutricionales y del Metabolismo Sección 12.
39. Merma Polanco M., Velásquez Cotrado D.: “EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ZEA MAYZ L. MAIZ VARIEDAD MORADO A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL SUERO DE RATAS. Universidad Católica de Santa María, Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica. Arequipa, Perú 2008.
40. Mostacero J.; Mejia F.; Gamarra O.: TAXONOMÍA DE LAS FANERÓGAMAS ÚTILES DEL PERÚ. 1ª Edición. 2002. Editorial NormasLegales S.A.C. Perú.
41. MURRAY, R. MAYES, P. GRANNER, D. RODWELL, V. “Bioquímica de Harper”. Editorial el Manuel Moderna. México. 1998.
42. Nuñez, Carlos Eduardo. “Extracciones con equipo Soxhlet”. 2007.
43. Ortiz Udeo A.F.: “EFECTO HIPOLIPEMIANTE DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE FRUTIPAN (*Artocarpusaltilis*), EN RATAS (*Rattusnovergicus*) CON HIPERLIPIDEMIA INDUCIDA- 2012.”, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
44. RAYMOND CHANG.: “Química General” 7ª Edición.
45. Stryer, L. et al., Biochemistry, 5ta Edicion, New York, W.H. Freeman, 2002.
46. Vila Jato, J.L. “TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA: ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LOS SISTEMAS FARMACÉUTICOS Y OPERACIONES BÁSICAS” 1ra Edición. Editorial Síntesis S.A. Madrid-España. 2001.

47. TORRES, M.: “Lípidos y Lipoproteínas plasmáticas” Rev. Cubana Cardiol Cir. Cardiocasc. capítulo 12. 1998.
48. Trudy McKee: BIOQUÍMICA, LA BASE McGraw Hill Interamericana. Colombia.





ANEXO N°1. Prueba piloto

Prueba piloto: Extracto con éter de petróleo

Grupos		Triglicéridos mg/dL
Basal	1	22
	2	21
	3	20
	Total N	3
Grupo de tratamiento Piloto	1	34
	2	36
	3	31
	Total N	3
Éter de petróleo 500mg/kg	1	30
	2	32

	3	33	
	Total	N	3
Éter de petróleo 1000mg/kg	1	27	
	2	28	
	3	29	
	Total	N	3
	Total	N	12



Prueba piloto: Extracto con cloroformo

Grupos		Triglicéridos mg/dL	
Grupo de tratamiento Piloto	Basal	1	29
		2	25
		3	25
		Total	N
	Inducción	1	34
		2	37
		3	38
		Total	N
	Extracto cloroformo 500mg/kg	1	33
		2	35
		3	30
		Total	N
	Extracto cloroformo 1000mg/kg	1	28
		2	29
		3	32
		Total	N
Total		N	12

Prueba piloto: Extracto con alcohol étlico

Grupos		Triglicéridos mg/dL
Grupo de tratamiento Piloto	Basal	1 21
		2 19
		3 22
	Total	N 3
	Inducción	1 37
		2 36
		3 33
	Total	N 3
	Extracto etanólico 500mg/kg	1 30
		2 31
		3 28
	Total	N 3
	Extracto etanólico 1000mg/kg	1 19
		2 23
		3 25
	Total	N 3
	Total	N 12

ANEXO N°2. Prueba Final

Grupo control		Colesterol Total	Trigliceridemia	HDL colesterol	LDL colesterol	Peso corporal
Basal (tiempo 0)	1	51	18	11.6	34.8	240
	2	63	19	11.2	34.2	255
	3	53	22	12.8	37.2	274
	4	60	22	12.3	37.3	238
	5	55	21	11.0	38.9	248
	Total N	5	5	5	5	5
Hipercolesterolemia	1	85	30	15.1	46.7	254
	2	78	35	14.4	44.6	249
	3	94	31	18.8	66.2	280
	4	84	33	16.6	51.0	265
	5	89	36	17.3	55.8	270
	Total N	5	5	5	5	5
15 días tratamiento	1	80	37	15.3	50.4	277
	2	73	36	15.2	52.4	255
	3	85	39	14.3	50.3	264
	4	79	38	13.3	49.3	260
	5	78	34	13.4	48.5	259
	Total N	5	5	5	5	5
30 días tratamiento	1	67	30	9.8	38.7	246
	2	72	29	10.1	35.6	252
	3	68	27	11.3	42.3	275
	4	80	31	10.8	36.6	246
	5	75	28	11.1	35.6	255
	Total N	5	5	5	5	5
Total	N	20	20	20	20	20

Grupo Extracto de chía		Colester o Total	Trigliceridemi a	HDL colestero l	LDL colestero l	Peso corpora l
Basal (tiempo 0)	1	49	17	8.9	25.9	251
	2	65	19	11.0	33.0	255
	3	54	21	11.9	35.9	249
	4	58	18	10.8	34.3	252
	5	53	16	11.2	28.9	247
	Total	5	5	5	5	5
Hipercolesterole mia	1	78	38	15.1	57.1	260
	2	89	32	18.6	57.0	258
	3	88	32	19.7	53.2	259
	4	90	31	18.3	55.4	261
	5	81	35	18.0	53.3	270
	Total	5	5	5	5	5
15 días tratamiento	1	75	29	17.5	45.6	251
	2	72	26	16.4	43.4	265
	3	77	28	15.3	48.9	258
	4	82	27	14.0	49.6	265
	5	70	30	13.6	43.1	259
	Total	5	5	5	5	5
30 días tratamiento	1	50	22	10.0	42.4	249
	2	66	26	10.2	30.3	269
	3	54	27	9.7	31.8	248
	4	63	24	9.1	35.6	250
	5	61	22	12.3	33.9	246
	Total	5	5	5	5	5
Total		N	20	20	20	20

Grupo Gemfibrozilo		Colester o Total	Trigliceridemi a	HDL colestero l	LDL colestero l	Peso corpora l
Basal (tiempo 0)	1	55	23	11.6	37.4	257
	2	62	25	11.4	34.4	240
	3	52	25	12.8	33.6	253
	4	57	24	10.6	31.2	250
	5	53	24	11.3	33.4	258
	Total	5	5	5	5	5
Hipercolesterole mia	1	86	34	18.6	58.6	268
	2	90	30	15.7	49.5	259
	3	85	36	15.3	46.5	257
	4	92	34	17.9	47.8	265
	5	88	32	18.1	50.1	269
	Total	5	5	5	5	5
15 días tratamiento	1	79	28	14.3	48.5	255
	2	72	27	14.1	47.6	260
	3	65	26	13.3	48.0	258
	4	67	28	16.5	46.7	257
	5	75	27	14.0	49.8	260
	Total	5	5	5	5	5
30 días tratamiento	1	51	24	12.8	37.2	249
	2	60	23	13.7	36.2	251
	3	57	24	10.5	38.1	255
	4	59	25	11.9	40.3	249
	5	58	28	12.1	39.8	253
	Total	5	5	5	5	5
Total	N	20	20	20	20	20

ANEXO N°3.

CALCULO DE LA DOSIS DE EXTRACTO DE *Salvia hispánica* L. (chía)

- Dosis de 500 mg/kg/día

$$\begin{array}{rcl} 500 \text{ mg} & \text{—————} & 1000\text{g} \\ X & \text{—————} & 250\text{g} \\ X = & 125 \text{ mg} & \end{array}$$

- Dosis de 1000 mg/kg/día

$$\begin{array}{rcl} 1000 \text{ mg} & \text{—————} & 1000\text{g} \\ X & \text{—————} & 250\text{g} \\ X = & 250 \text{ mg} & \end{array}$$

- Dosis de Gemfibrozilo

$$\begin{array}{rcl} 1200 \text{ mg} & \text{—————} & 70000\text{g} \\ X & \text{—————} & 250\text{g} \\ X = & 4.5 \text{ mg} & \end{array}$$